

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

FONCTION DE RGA-7 DANS LES CELLULES DE L'ÉPIDERME LORS DE
L'ÉLONGATION EMBRYONNAIRE DE *CAENORHABDITIS ELEGANS*

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA
MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR
MARIE-HÉLÈNE OUELLETTE

MARS 2016

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Il est important pour moi de remercier tous les gens qui m'ont soutenus lors de mon parcours de maîtrise.

Je dédie donc ce mémoire à mes parents, mes amis ainsi qu'à mes collègues de laboratoire. Vous avez tous enrichi ces années de recherche par votre présence, vos conseils et votre authenticité.

Un merci tout spécial à ma directrice de recherche, Sarah Jenna, pour avoir cru en moi et m'avoir donné cette extraordinaire opportunité de faire ma maîtrise dans un laboratoire aussi complet et intéressant.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX.....	v
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES ABBRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	ix
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS.....	xii
RÉSUMÉ	xiii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	
1.1 Caenorhabditis elegans	1
1.1.1 Présentation du modèle.....	1
1.1.2 Développement embryonnaire.....	3
1.1.3 Morphogénèse.....	6
1.2 Les RHO GTPases.....	16
1.2.1 Trois principales Rho gtpases	17
1.2.2 Les régulateurs	23
1.2.3 Les RHO GTPases et la migration collective	30
1.2.4 Les RHO GTPases et la migration collective chez <i>C. elegans</i>	38
1.3 RGA-7	40
1.3.1 Domaine F-Bar	41
1.3.2 Domaine C1	43
1.4 Potentiels orthologues de RGA-7 chez l'Homme	44
1.4.1 PARG1/ArhGAP29	46
1.4.2 HMHA1/HA-1	48
1.4.3 GMIP	50

1.5 OBJECTIF DU PROJET DE MAITRISE	52
 CHAPITRE II	
SPATIAL CONTROL OF ACTIVE CDC-42 DURING COLLECTIVE MIGRATION OF HYPODERMAL CELLS IN <i>CAENORHABDITIS</i> <i>ELEGANS</i>	53
Résumé	54
Abstract	55
Introduction	56
Results	61
Discussion	86
Methods	94
Acknowledgements	98
References.....	100
Supplementary Data	115
Supplementary Methods	121
Supplemental References.....	125
 CHAPITRE III	
MÉTHODES ET RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES	127
3.1 Méthodes supplémentaires	127
3.2 Résultats supplémentaires	135
 CHAPITRE IV	
DISCUSSION	142
 CHAPITRE V	
CONCLUSION	153
BIBLIOGRAPHIE	154

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Amorces pour géotypage.....**128**

Tableau II. Séquences des amorces utilisées pour les constructions
des lignées transgéniques.....**130**

LISTE DES FIGURES

Figures de l'introduction (Chapitre I)

Figure 1. Développement embryonnaire chez <i>Caenorhabditis elegans</i>	5
Figure 2. Mécanismes de réarrangements cellulaires chez <i>Caenorhabditis elegans</i> , <i>Xenopus</i> et <i>Drosophila melanogaster</i>	7
Figure 3. Fermeture ventrale chez <i>Caenorhabditis elegans</i>	9
Figure 4. Voies contrôlant l'élongation précoce chez <i>Caenorhabditis elegans</i>	13
Figure 5. Les différentes structures impliquées dans l'élongation tardive chez <i>Caenorhabditis elegans</i>	15
Figure 6. Arbre phylogénique des GTPases Rho chez l'Homme ..	18
Figure 7. Cycle des Rho GTPases	25
Figure 8. Migration collective chez <i>Drosophila melanogaster</i> , <i>Danio rerio</i> (zebrafish), <i>Xenopus laevis</i> et <i>Homo sapiens</i>	31
Figure 9. Voies de signalisation contrôlant la fermeture ventrale chez <i>Caenorhabditis elegans</i>	39
Figure 10. Structure protéique de RGA-7/SPV-1	40
Figure 11. Arbre phylogénétique du domaine F-BAR des potentiels orthologues de RGA-7	46

Figures de l'article (Chapitre II)

Figure 12. <i>rga-7</i> controls ventral enclosure	64
Figure 13. RGA-7 is a GAP for CDC-42 and RHO-1 and controls ventral enclosure in an antagonistic manner with WSP-1 and in parallel with LET-502	67
Figure 14. <i>rga-7</i> controls the protrusive activity of leading cells during ventral enclosure	71
Figure 15. RGA-7::GFP is located at intracellular compartments and recruited to cell-cell junctions.....	73
Figure 16. <i>rga-7</i> controls the accumulation of activated CDC-42 at proximal junction between adjacent leading cells	76
Figure 17. <i>rga-7</i> , <i>wsp-1</i> and <i>toca-1/2</i> regulate the expansion of cell-cell junction between contralateral cell.....	80
Figure 18. RGA-7 regulates the distribution of activated CDC-42 clusters at cell-cell junctions	84
Figure 19. RGA-7 functions during collective migration of hypodermal cells and cell-cell junction formation	87

Figures des méthodes et résultats supplémentaires (Chapitre III)

Figure 20. Réaction de recombinaison Gateway (BP)	131
Figure 21. Réaction de recombinaison Gateway (LR).....	132
Figure 22. Le domaine F-Bar de RGA-7 n'est pas requis lors de la fermeture ventrale.....	137
Figure 23. RGA-7 agit dans la même voie que PAK-1 mais dans une voie différente de PIX-1 lors de la fermeture ventrale	140

Figures de la discussion (Chapitre IV)

Figure 24 Structure et domaines prédits pour les orthologues de RGA-7 chez l'Homme	151
--	------------

Figures supplémentaires de l'article (Chapitre II)

Supplemental Figure 1. Molecular characterization of <i>rga-7</i>	104
--	------------

Supplemental Figure 2. Localization of RGA-7::GFP in adults ..	106
--	------------

Supplemental Figure 3. RGA-7 function during ventral enclosure is independent form its function in spermatheca.....	108
---	------------

Supplemental Figure 4. CFP::CDC-42 tend to accumulate at proximal junction between migrating leading cells.....	109
---	------------

Supplemental Figure 5. <i>rga-7</i> , <i>wsp-1</i> and <i>toca-1/2</i> are required for filamentous actin accumulation at distal junctions between adjacent leading cell	111
--	------------

Supplemental Figure 6. RGA-7's function during ventral enclosure is independent from its function in spermatheca.....	113
---	------------

Supplemental Figure 7. Distribution of actin clusters at cell-cell junction.....	114
--	------------

LISTE DES ABBRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

14-3-3	Complexe zeta-sérotonine N-acétyltransférase
3D	Tri-dimensionnel
AB (ABa/ABp)	Cellule fondatrice embryonnaire de <i>C. elegans</i>
ADN/ARN	Acide Déoxyribonucléique/ Acide ribonucléique
Arp2/3	Complexe de nucléation de l'actine
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
aPKC	Protéine kinase C atypique
BAR	Bin/Amphyphysin/Rvs
CDC-42/Cdc42	Cell division control protein 42
C1	Domaine de liaison aux phorbol-esters et DAG
C2	Domaine d'adressage aux membranes
Cdc24	Guanine nucleotide exchange factor 24
CED-10/Rac	Cell Death abnormality 10(orthologue <i>C. elegans</i> de Rac chez l'Homme)
CIP4	Cdc42 interacting protein 4
DH	Dbl homology domain
DIE-1	Dorsal Intercalation and Elongation defect
Drac1	Orthologue de Rac chez <i>Drosophila melanogaster</i>
FCH	F-Bin/Ampiphysin
GAP	GTPase Activating Protein
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
GDI	Guanosine nucleotide Dissociation Inhibitor
GDP/GTP	Guanosine di/tri-phosphate
GFP	Green Fluorescent Protein

GIT-1	G protein-coupled receptor kinase Interactor-1
GPI-APs	Glycophosphatidylinositol Anchor Proteins
GMIP	Gem Interacting Protein
HMHA1/HA-1	Histocompatibility (minor) HA-1
IRSp53	Insulin Receptor Substrate Protein of 53 kDa
JFC-1	Synaptotagmin-like protein
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
LET-502/ROCK	Rho-Associated Protein Kinase
LC	Leading Cells
mDia2	Mouse Diaphenous 2
MEL-11	Maternal Effect Lethal 11
MIG-2	Abnormal cell migration 2 (Rho GTPase)
MLC-4	Myosin Light Chain 4
MRCK-1	Myotonic dystrophy related, Cdc42-binding Kinase homolog
Munc13	Mammalian homolog of unc-13
NMY-1/NMY-2	Non-muscle myosin 1/2
N-WASP	Neural Wiskott-Aldrich Syndrom Protein
ORF	Open Reading Frame
PAK-1	P21-Activated Kinase
Par6/Par3	Polarity protein
PARG1/ArhGAP29	Poly(ADP-ribose) glycohydrolase 1
PC	Pocket Cells
PCR	Polymerase Chain Reaction
PH	Pleckstrin homology domain
PIX-1	PAK interacting exchange factor homolog
PKD1	Protein Kinase D

PLC-1	Phosphatidylinositol phospholipase C
Radil	Ras-associating and dilute domain-containing
Rap1/Rap2	Ras proximate or related protein 1/2
Rasip	Ras interacting protein 1
RGA-7	Rho GTPase Activating Protein 7
RT-PCR	Reverse Transcription PCR
SH3/SH2	SRC Homology domain 3/2
Snail/SNAI1	Snail family zinc finger protein
SOS	Son of Sevenless
SPV-1	Spermatheca physiology variant 1
TBX-8/TBX-9	T-Box family protein 8/9
Tiam1	T-lymphoma invasion and matastasis-inducing
UNC-34/VASP	Vasodilator-Stimulated phosphoprotein
Vav2	Guanine nucleotide exchange factor VAV2
WVE-1/WAVE	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member
WSP-1/Wasp	Wiskott-Aldrich syndrome protein homolog

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

kb	Kilo bases
mL	Millilitres
mm	Millimètres
μg	Microgramme
μm	Micromètres

RÉSUMÉ

La migration collective des cellules épithéliales est un processus conservé chez les animaux multicellulaires. Il est essentiel à la morphogénèse des tissus et lors de la formation de métastases dans les cas de carcinomes. Pourtant, plusieurs des mécanismes la contrôlant au niveau moléculaire restent à élucider. Dans les cellules mammifères, la migration cellulaire collective est contrôlée par le cytosquelette d'actomyosine et régulée par les Rho GTPases RhoA/RHO-1 et Cdc42/CDC-42. Ce processus est très bien représenté chez *Caenorhabditis elegans* par un stade nommé fermeture ventrale. Lors de la fermeture ventrale, les cellules ventrales de l'hypoderme migrent vers la face ventrale de l'embryon et se joignent en son centre. Cette migration est dirigée par la migration des cellules "meneuses" qui forment des protrusions riches en actine, contrôlées par WSP-1/WASp/N-WASP, un effecteur spécifique de CDC-42/Cdc42. Nous avons identifié RGA-7 comme une nouvelle protéine régulatrice de CDC-42 dans les cellules de l'hypoderme au cours de la fermeture ventrale. RGA-7 agit de façon antagoniste avec WSP-1, TOCA1/2/FBP17/Toca1, un régulateur connu de l'endocytose, et en parallèle de LET-502/ROCK, un effecteur connu de RHO-1. Nous montrons que la fonction de RGA-7 induit la formation des protrusions au niveau des cellules meneuses. Nos résultats démontrent également que RGA-7 est recruté aux jonctions cellules-cellules au cours de leur maturation, et qu'il régule la distribution de la forme active de CDC-42/Cdc42 à ces jonctions au cours de la fermeture ventrale.

MOTS CLÉS: migration collective, fermeture ventrale, CDC-42, *C. elegans*, WASP

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 *Caenorhabditis elegans*

1.1.1 Présentation du modèle

La classe des nématodes a été très appréciée et étudiée par les biologistes au cours des cinquante dernières années dû à leur simplicité de structure et leur développement rapide (Sulston et al., 1983). Un de ces nématodes est devenu un organisme modèle en génétique : le *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Les premières études l'impliquant furent celles de Brenner en 1974. Brenner a trouvé dans cet organisme, un modèle expérimental multicellulaire qui se prêtait facilement aux études génétiques et permettait d'analyser la structure complète d'un système nerveux dans un organisme vivant (Brenner, 1974).

Le *C. elegans* est, de plus, le premier organisme multicellulaire dont le génome entier fut séquencé en 1998 (C. e. S. Consortium, 1998). C'est un nématode microscopique atteignant un millimètre de long et composé d'un millier de cellules à l'âge adulte. Il présente deux genres : les hermaphrodites et les mâles. Cette particularité permet de maintenir des populations clonales par autofécondation des hermaphrodites mais aussi de générer de

nouveaux génotypes par croisement entre individus hermaphrodites et mâles (Brenner, 1974).

Il importe aussi de noter l'avantage de son cycle de vie rapide : de 3 jours et demi, soit le temps nécessaire pour qu'un embryon devienne un adulte capable de pondre des œufs. Ce développement implique le passage par quatre stades larvaires après l'éclosion des embryons (Sulston and Horvitz, 1977).

La transparence de l'embryon permet l'observation de toutes les cellules du corps, à tous les stades du développement par microscopie à fond clair ou à fluorescence (Kimble and Hirsh, 1979).

Lors du développement embryonnaire, un programme spécifique de division et de migration cellulaire se produit pour générer les différents organes de l'organisme (Sulston and Horvitz, 1977). L'observation des divisions cellulaires de l'embryon et leur positionnement invariant d'un embryon à l'autre, ont permis d'établir un lignage précis des cellules des larves (Sulston and Horvitz, 1977; Kimble and Hirsh, 1979) et des embryons (Deppe et al., 1978; Sulston et al., 1983). Cette étude a permis de débiter la caractérisation des programmes génétiques contrôlant la différenciation cellulaire et les mouvements cellulaires nécessaires au développement (Sulston et al., 1983).

De nombreux processus développementaux sont conservés entre les nématodes et les mammifères. Environ 40% des gènes humains

ont un homologue très proche chez le ver. Les Rho GTPases identifiées chez *C. elegans*, par exemple, ont de 60 à 90% d'homologie de séquence protéique avec leurs plus proches homologues mammifères (Shaye and Greenwald, 2011).

Prises ensemble, toutes ces caractéristiques font de *C. elegans* un modèle de choix pour étudier le développement embryonnaire et la fonction des protéines dans leur contexte tissulaire tridimensionnel.

1.1.2 Développement embryonnaire

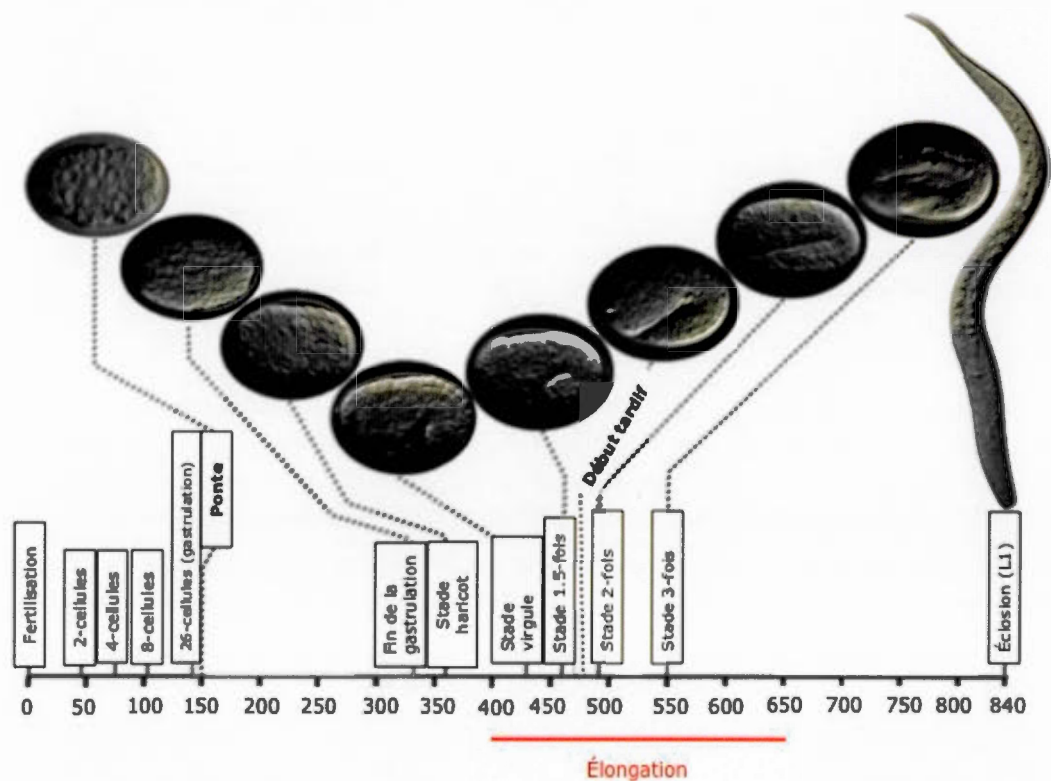
Le développement embryonnaire dure 14h à 20°C et est divisé en trois phases distinctes. Durant la première phase, les cellules se divisent et se déplacent les unes par rapport aux autres pour former les organes. On appelle cette étape la morphogénèse (Bucher and Seydoux, 1994) (Figure 1).

Les premiers moments, suivant la fécondation, sont importants car il s'agit du moment où l'axe antéro-postérieur est établi. Celui-ci dépend de la position du pronucléus mâle (postérieur). L'axe dorso-ventral est, par la suite, défini suivant l'axe de division de la cellule fondatrice (AB) en ABa (antérieure) et ABp (postérieure). L'axe gauche-droite est, pour sa part, défini par la disposition spatiale de la cellule ABp (Gilbert, 2000).

Par la suite, une série de divisions cellulaires se produisent puis l'embryon est pondu au moment de la gastrulation (Bucher and

Seydoux, 1994; Altun, 2005). À ce stade, toutes les cellules fondatrices sont présentes et c'est alors que les précurseurs de l'intestin, de la lignée germinale, du pharynx et des muscles se rassemblent à l'intérieur de l'embryon, les cellules de l'hypoderme recouvrant alors le côté dorsal et latéral tandis que les neuroblastes sont à la surface du côté ventral. La fente gastrulaire se ferme finalement par le mouvement de l'ectoderme (composé des neuroblastes, neurones et cellules gliales) entre 270-330 minutes (Bucher and Seydoux, 1994; Chin-Sang and Chisholm, 2000). C'est alors que la morphogénèse de l'épiderme débute. Cette étape tardive du développement embryonnaire permet de transformer un embryon ovoïde à une larve vermiforme.

Figure 1. Développement embryonnaire chez *Caenorhabditis elegans*. Les différentes étapes du développement embryonnaire chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. De la fécondation (temps 0) jusqu'à l'éclosion au premier stade larvaire 840 minutes plus tard.



Adapté de (Altun, 2005)

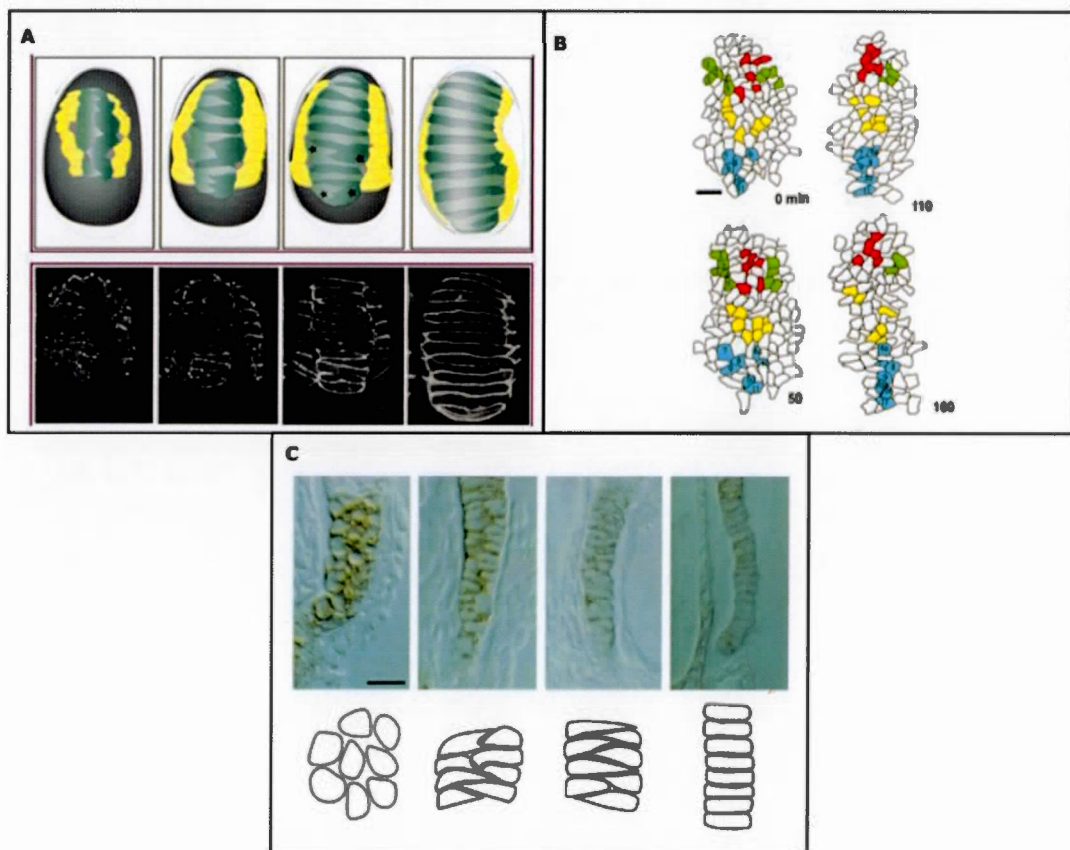
1.1.3 Morphogénèse

La morphogénèse de l'épiderme du *C. elegans* se divise en plusieurs étapes qui sont détaillées ci-dessous.

1.1.3.1 Intercalation dorsale

L'intercalation dorsale est la première étape de morphogénèse de l'embryon chez *C. elegans* (Figure 2A). Elle implique des mécanismes de réarrangements cellulaires conservés entre les vertébrés et les invertébrés. Elle s'apparente à des mécanismes dirigeant l'intercalation durant le développement de la notochorde chez le Xenope (Keller et al., 1989) (Figure 2B) et la formation de filaments terminaux chez la Drosophile (Godt and Laski, 1995) (Figure 2C).

Figure 2. Mécanismes de réarrangements cellulaires chez *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus* et *Drosophila melanogaster*. Mécanismes de réarrangement cellulaire chez différents organismes modèles. (A) Intercalation dorsale chez *Caenorhabditis elegans* schématisée (haut) et en microscopie confocale avec un marqueur de jonction cellulaire : AJM-1::GFP (bas) (B) Schéma de la formation de la notochorde par intercalation chez *Xenopus* (C) Intercalation des cellules basales de l'ovaire marquées par un anticorps (haut) chez *Drosophila melanogaster* et schématisation (bas).



Adapté de (Chisholm and Hardin, 2005), (Elul and Keller, 2000) et (Godt and Laski, 1995)

Le peu de cellules de l'hypoderme du *C. elegans* impliqué dans l'intercalation dorsale et l'invariabilité de l'architecture cellulaire

entre les embryons font de ce modèle un excellent modèle pour étudier les mécanismes de réarrangement épithélial au niveau cellulaire et moléculaire (Williams-Masson et al., 1998).

La réorganisation des microfilaments d'actine ainsi que des microtubules sont nécessaires à l'intercalation dorsale (Heid et al., 2001). Les cellules dorsales de l'embryon vont créer des protrusions membranaires basolatérales riches en actine. Ces protrusions vont diriger la réorganisation des jonctions apicales entre les cellules de l'hypoderme dorsal et ainsi leur déplacement relatif. L'ensemble du processus semble être indépendant des muscles sous-jacents et des autres cellules de l'hypoderme (Williams-Masson et al., 1998; Heid et al., 2001).

Peu de gènes ont été, à ce jour, identifiés dans le contrôle de l'intercalation dorsale. Parmi eux, le facteur de transcription en doigt de Zinc DIE-1 (Heid et al., 2001), les protéines T-Box redondantes TBX-8 et TBX-9 (Andachi, 2004) et la phospholipase C (PLC-1) (Vázquez-Manrique et al., 2008). Cependant, les mécanismes moléculaires précis contrôlant cette étape de la morphogénèse restent encore peu compris.

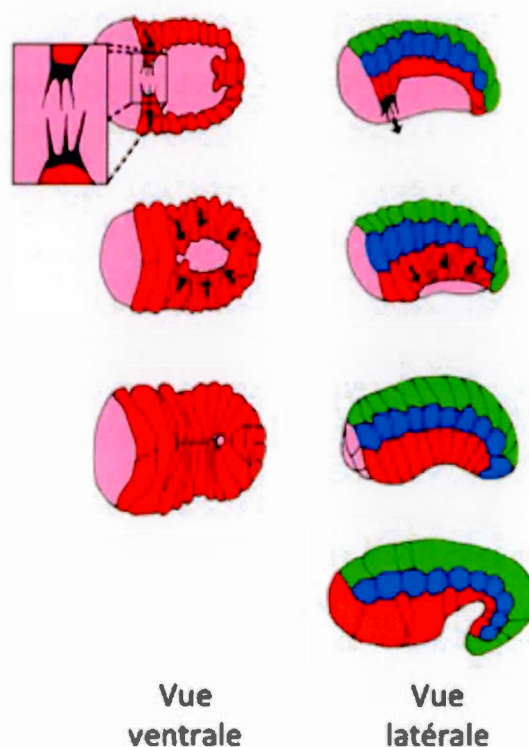
1.1.3.2 Fermeture ventrale

Peu après le début de l'intercalation dorsale, la fermeture ventrale débute. Lors de ce processus, les cellules ventrales de l'hypoderme migrent vers la partie ventrale de l'embryon pour se

fermer en son centre (Chisholm and Hardin, 2005). Cette migration caractérisée comme collective, puisqu'elle implique le maintien de la polarité apico-basale des cellules de l'hypoderme, se déroule en deux phases : la migration des cellules meneuses (*leading cells* - LC) (Williams-Masson et al., 1997) puis celle des cellules postérieures (*pocket cells* - PC) (Figure 3).

Figure 3. Fermeture ventrale chez *Caenorhabditis elegans*.

Schéma de la fermeture ventrale chez un embryon de *C. elegans* en vue ventrale (gauche) et latérale (droite).



Adapté de (Keller, 2006)

Les deux étapes de la fermeture ventrale sont régulées par des Rho GTPases, dont la fonction moléculaire sera détaillée ultérieurement (section 1.2.3). Le complexe cadhérine/caténine est également essentiel à la migration des cellules meneuses. Le maintien et la réorganisation de ces complexes jonctionnels sont essentiels au maintien de la cohésion de l'épithélium au cours de la migration et à la formation de nouvelles jonctions entre les cellules contralatérales (Raich et al., 1999).

Les cellules meneuses migrent vers la partie ventrale de l'embryon tractée par de grandes protrusions riches en actine (Thomas-Virnig et al., 2004). Les cellules, quant à elles, migrent grâce à un processus dépendant de la formation de la myosine à l'avant des cellules en cours de migration. Ce dernier est moins bien compris que les précédents et est appelé : *purse-string* (Williams-Masson et al., 1997).

Une fois la fermeture ventrale terminée, l'épiderme est fermé, l'embryon se retourne et commence alors son élongation. Anatomiquement, l'hypoderme est alors composé de deux rangées de cellules ventrales, deux rangées de cellules latérales et une rangée de cellules dorsales (Priess and Hirsh, 1986).

1.1.3.3 Élongation

L'élongation est la dernière phase de la morphogénèse où l'embryon va réduire sa circonférence et s'allonger jusqu'à 4 fois pour devenir une larve vermiforme (McKeown et al., 1998).

L'épiderme est encore une fois essentiel à cette étape de la morphogénèse (Priess and Hirsh, 1986) qui est divisée en deux phases : l'élongation précoce et tardive.

1.1.3.3.1 Élongation précoce

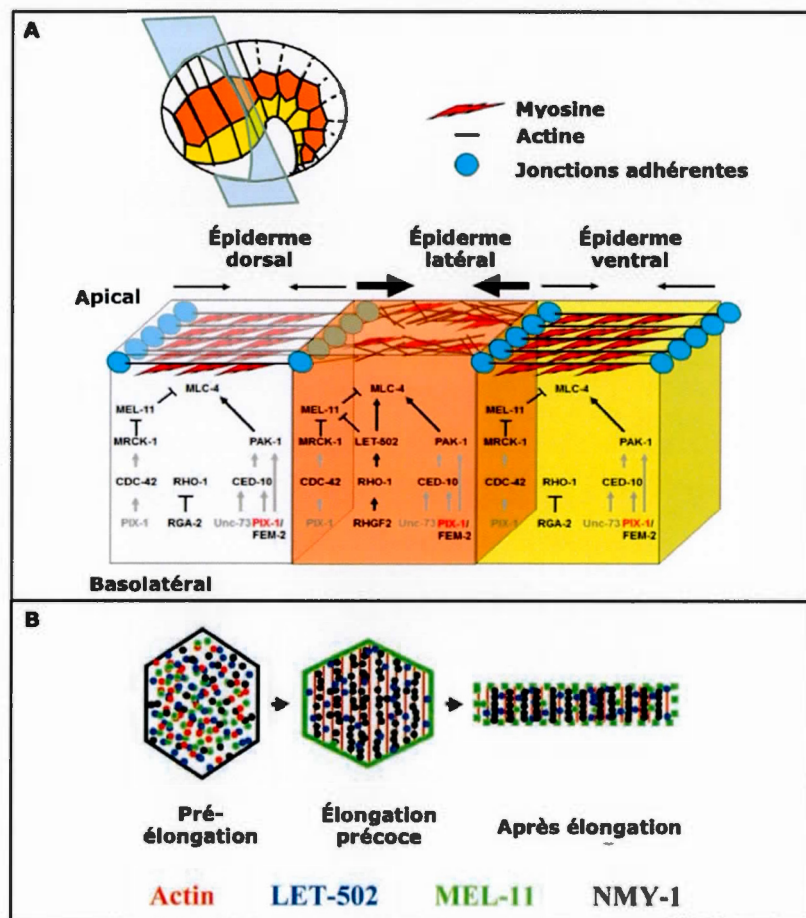
L'élongation précoce est conduite par la contraction du système contractile actine-myosine dans les cellules de l'épiderme. Les cellules ventrales et dorsales sont alors dans un état dit « relâché » tandis que les contractions conduisant à l'élongation se produisent dans les cellules latérales (Priess and Hirsh, 1986; Piekny et al., 2003).

Les contractions sont dépendantes de l'état de phosphorylation des chaînes légères de myosine (MLC), MLC-4 qui phosphorylée entraîne la contraction des chaînes lourdes de myosine (NMY-1 et NMY-2). L'état de phosphorylation de MLC-4 dépend de l'activation des kinases LET-502/Rock, MRCK-1/Mrck et PAK-1/Pak1 ainsi que de la phosphatase MEL-11/PP-1M. Ces kinases et phosphatases sont régulées par des Rho GTPases (Piekny et al., 2000; Gally et al., 2009; Martin et al., 2014)

La GTPase RHO-1 active LET-502 qui phosphoryle alors MLC-4 et inhibe MEL-11 (Piekny et al., 2000) entraînant une relocalisation de MEL-11 à la membrane plasmique (Piekny et al., 2003); Figure 4 B). MEL-11, pour sa part, est possiblement activée en aval de la

GTPase MIG-2 (Piekny et al., 2000) et inactivée par MRCK-1 (Gally et al., 2009) qui serait un effecteur potentiel de CDC-42 (Figure 4). L'élongation précoce requiert également PIX-1, un activateur (GEF) de CDC-42 et de CED-10/Rac, qui fonctionne de concert avec PAK-1, un effecteur des ces deux GTPases au cours de l'élongation tardive (Zhang et al., 2011). Au cours de l'élongation précoce, PIX-1 et PAK-1 réguleraient la morphogenèse de l'hypoderme principalement dans la partie antérieure de l'embryon (Martin et al., 2014).

Figure 4. Voies contrôlant l'élongation précoce chez *Caenorhabditis elegans*. (A) Schéma d'un embryon en élongation précoce et des voies de signalisation, présentes dans l'épiderme dorsal (blanc), latéral (orange) et ventral (jaune), contrôlant la contraction de la myosine. (B) Schéma de la régulation de l'élongation des cellules latérales. L'actine est désorganisée puis les filaments deviennent perpendiculaires à la direction du changement de forme des cellules en élongation précoce. LET-502, MEL-11 et NMY-1 sont localisés de façon homogène dans la cellule avant l'élongation. NMY-1 s'organise progressivement le long des filaments d'actine permettant ainsi leur contraction. La phosphorylation de MEL-11 par LET-502 entraîne son inactivation et sa localisation à la membrane plasmique (Piekny et al., 2003; Martin et al., 2014).



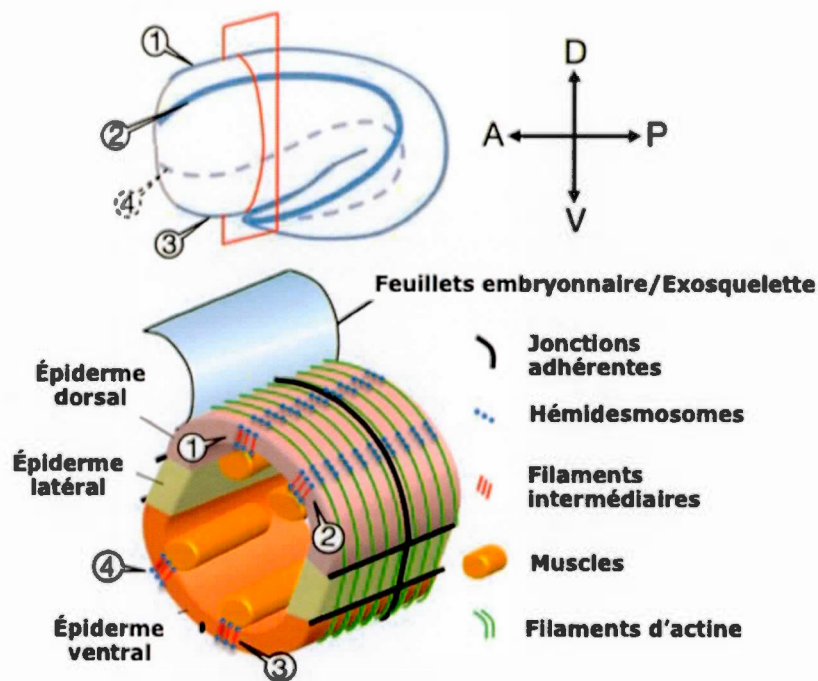
Adapté de (Piekny et al., 2003; Martin et al., 2014)

1.1.3.3.2 Élongation tardive

Lorsque l'embryon arrive à un repliement d'environ 1.75 sur lui-même, d'autres mécanismes se mettent en place pour continuer et achever l'élongation (Ding et al., 2004). C'est alors que les muscles deviennent actifs et que l'élongation tardive débute. Ce sont des mécanismes de mécanotransduction des muscles vers l'hypoderme qui conduisent à l'allongement final de l'embryon (Figure 5) (Zhang et al., 2011).

Les muscles interagissent avec les cellules de l'hypoderme ventral et dorsal grâce à des structures d'attachement de type hémidesmosome (Hresko et al., 1994). Ces structures permettent de transmettre les forces de contraction des muscles vers l'hypoderme (Francis, 1991; Hresko et al., 1994). Chez *C. elegans*, la mécanotransduction est dépendante de CED-10/Rac ainsi que de PAK-1, GIT-1 et PIX-1 (Zhang et al., 2011) recrutés aux hémidesmosomes par GIT-1 au début de l'élongation tardive. La contraction des muscles active NMY-2 et la voie PIX-1-PAK-1-GIT-1 provoquant, entre autres, la phosphorylation des filaments intermédiaires par PAK-1 (Zhang et al., 2011). Le recrutement de ce complexe protéique sera nécessaire à la maturation des hémidesmosomes et à la mécanotransduction afin de compléter la morphogénèse (Zhang et al., 2011).

Figure 5. Les différentes structures impliquées dans l'élongation tardive chez *Caenorhabditis elegans*. Schéma d'un embryon de *C. elegans* arrivant en élongation tardive et section schématisée avec les hémidesmosomes (4) et les structures cellulaires impliquées.



Adapté de (Zhang et al., 2011)

Chacune des étapes de la morphogénèse chez *Caenorhabditis elegans* implique les Rho GTPases. Il est donc impératif d'étudier la fonction de cette famille de protéines ainsi que leurs régulateurs et effecteurs au cours de mécanismes de morphogénèse.

1.2 Les RHO GTPases

Les Rho GTPases forment un des cinq sous-groupes des protéines G monomériques de la superfamille Ras, dont les autres sous-familles sont : Arf, Rab, Ran et Ras. Chacune de ces familles possède sa propre spécialisation (Primeau and Lamarche-Vane, 2008). En effet, les Ras régulent la différenciation cellulaire, la prolifération ainsi que la morphologie et l'apoptose, les Ran sont impliquées dans le transport nucléaire, les Arf et les Rabs jouent un rôle dans le transport vésiculaire (Rojas et al., 2012) (Zerial and McBride, 2001). Pour leur part, les Rho GTPases sont des régulateurs essentiels de nombreuses activités cellulaires. Elles sont reconnues, en particulier, pour leur rôle important dans la polarisation, l'organisation du cytosquelette cellulaire, la mise en place de voies de signalisation et le contrôle de la prolifération cellulaire (Hall, 1998). Elles sont également impliquées au niveau du trafic membranaire, de la transcription génique, de la progression du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la dynamique cellulaire (Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997).

D'autre part, la morphogénèse épithéliale dépend de la polarité cellulaire, de la dynamique de l'actine, des adhésions cellulaires et du trafic vésiculaire (Nelson, 2000; Van Aelst and Symons, 2002); processus où les Rho GTPases jouent un rôle prédominant.

Elles agissent comme des interrupteurs moléculaires cyclant entre un état actif (liées au GTP) et un état inactif (liées au GDP),

permettant d'exécuter ces processus complexes et sont souvent liées aux membranes par un domaine lipidique en C-terminal (Primeau and Lamarche-Vane, 2008).

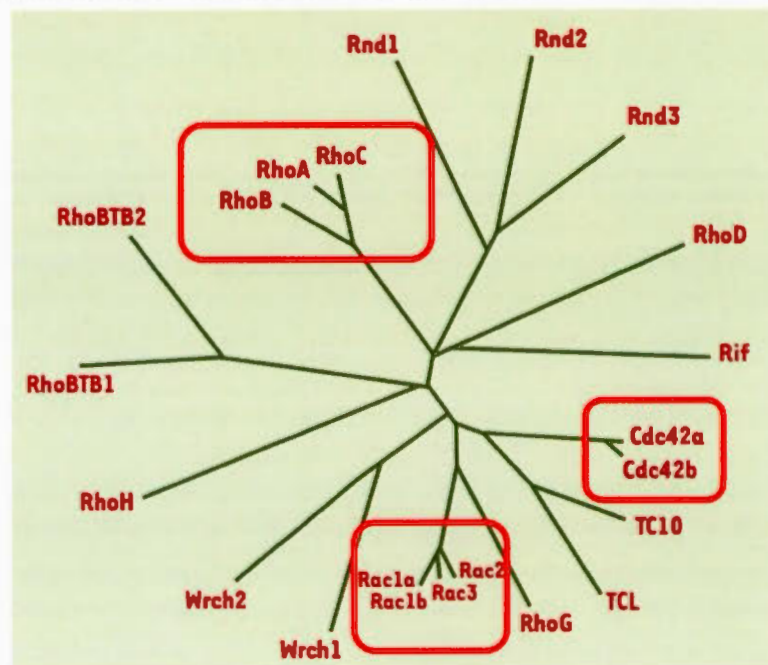
Il est à noter que 20 Rho GTPases furent identifiées dans le génome humain (Boureux et al., 2007) et que, de ce nombre, six ont un homologue chez *C. elegans* : RhoA/*rho-1*, Cdc42/*cdc-42*, Rac1/*ced-10*, *rac2*, RhoG/*mig-2* et Wrch/RhoU/*crp-1* (Lundquist, 2006) (Jenna et al., 2005).

1.2.1 Trois principales Rho GTPases

Malgré la caractérisation de plus en plus de Rho GTPases dans cette grande famille, les trois GTPases les plus étudiées sont : RhoA, Cdc42 et Rac (Figure 6).

Figure 6. Arbre phylogénique des Rho GTPases chez l'Homme.

Plus de vingt gènes codent pour des Rho GTPases chez *Homo sapiens*. Les carrés rouges mettent en avant les familles qui seront décrites ci-dessous.



Adapté de (Primeau and Lamarche-Vane, 2008)

En aperçu, chez les mammifères, chacune d'entre elles a sa propre façon d'agir sur le cytosquelette : Rac conduit à la formation de lamellipodes et est impliquée directement dans la migration cellulaire tandis que Cdc42 agit sur la formation des filopodes riches en actine, la migration et la polarité. Enfin, RhoA joue un rôle dans la formation de fibres de stress (Primeau and Lamarche-Vane, 2008).

1.2.1.1 Rho

Il existe trois membres de la famille Rho : RhoA, RhoB et RhoC très semblables structurellement, atteignant jusqu'à 92% d'identité au niveau de leur séquence protéique (Primeau and Lamarche-Vane, 2008). C'est leur partie C-terminale qui les distinguent les uns des autres (Armstrong et al., 1995).

Chez les mammifères, dans les cas de cancer, les Rho GTPases sont rarement mutées directement mais leur degré d'expression est modifié.

RhoA a été montrée comme un régulateur du cycle cellulaire (Zalcman et al., 1995; Olson et al., 1998). Mais, elle a été également montrée avec RhoC comme surexprimée dans plusieurs types de cancers avec un rôle potentiel dans l'invasion, les métastases et la survie. De plus, leur niveau d'expression augmente en présence de stress cellulaires ou de facteurs de croissance (van Golen et al., 2000; Turcotte et al., 2003).

L'implication de RhoB dans la formation de tumeurs est plus controversée. Certaines études lui attribuent des propriétés de suppresseur de tumeur dans les cas de cancer gastrique, pulmonaire et dans les carcinomes squameux au niveau du cou et de la tête car son expression corrèle inversement avec le grade des tumeurs étudiées (Adnane et al., 2002; Sato et al., 2007). Par contre, d'autres études montrent qu'il joue une fonction importante dans la prolifération et la survie des glioblastomes et qu'il promeut

l'induction de Ras. Il aide aussi à maintenir les phénotypes dits « malins » propres aux cancers et agit de concert avec des voies de signalisation pro-métastatique (Lebowitz et al., 1995; Prendergast et al., 1995; Ma et al., 2015).

1.2.1.2 Cdc42

La Rho GTPase Cdc42 a été découverte, tout premièrement, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* où elle est requise comme régulateur de la polarité cellulaire au cours de la division (Adams et al., 1990). Chez la levure, l'activité de Cdc42 permet la localisation d'une zone de la membrane plasmique appelée "cap" se trouvant à l'origine du bourgeonnement généré lors de la division cellulaire. Le positionnement de ce cap est contrôlé par la GEF (Guanine Exchange Factor) Cdc24 qui active Cdc42, le tout dépendant également du transport vésiculaire contrôlé par réorganisation du cytosquelette d'actine et l'endocytose (Adams et al., 1990; Chant and Herskowitz, 1991). Sans cette voie de signalisation, les caps polaires se forment de façon aléatoire (Adams et al., 1990; Howell and Lew, 2012). La forme sauvage de Cdc42 chez *Saccharomyces* est aussi régulée par une GDI (Guanosine nucleotide Dissociation Inhibitor), Rdi1, qui disloque la GTPase de la membrane, la rendant soluble dans le cytosol (Marco et al., 2007; Slaughter et al., 2009). La distribution sauvage de Cdc42 dépend donc de l'endocytose mais également de Rdi1 (Slaughter et al., 2009).

Chez les mammifères, Cdc42 régule le transport vésiculaire grâce à son interaction avec TOCA-1 et WASp/N-WASP (Bu et al., 2010). Cdc42 et TOCA-1 interagissent l'une avec l'autre ainsi qu'avec WASp/N-WASP qu'elles sont toutes deux capables d'activer (Ho et al., 2004). Une fois active, WASp/N-WASP active le complexe Arp2/3, déclenchant la nucléation de l'actine (Takenawa and Suetsugu, 2007; Chesarone and Goode, 2009). Il promeut ainsi l'assemblage de l'actine lors des premières étapes de la formation des vésicules mais quitte ces vésicules lorsque les molécules cargo deviennent plus abondantes (Chen et al., 2005). Ces mécanismes sont conservés chez *Drosophila melanogaster* (Fricke et al., 2009) et *C. elegans* (Giuliani et al., 2009).

Toujours chez les mammifères, au niveau du cortex cellulaire, Cdc42 régule l'exocytose, dans les cellules excrétoires, en conduisant à l'assemblage de l'actine au site d'exocytose (Gasman et al., 2004). De plus, elle régule positivement la pinocytose des protéines à ancre GPI (GPI-APs) par endocytose clathrine-indépendante mais dépendante de la polymérisation de l'actine, elle-même régulée par Cdc42 (Sabharanjak et al., 2002; Mayor and Pagano, 2007; Trifaro et al., 2008).

En plus de participer à plusieurs mécanismes de dynamique des membranes, Cdc42 se localise, dans les cellules MDCK et plusieurs autres cellules mammifères, au niveau du Golgi (Erickson et al., 1996). Au niveau du Golgi, Cdc42 régule les mécanismes de sécrétion polarisée des protéines (Park et al., 2015).

Par ailleurs, Cdc42 possède des fonctions différentes en culture tridimensionnelle (3D) versus bidimensionnelle. En culture 3D, les cellules sont mises dans un contexte ressemblant le plus possible à du *in vivo*; avec une matrice extracellulaire dans laquelle elles peuvent former des cystes et où la membrane basolatérale est en contact avec cette matrice alors que la membrane apicale fait face au lumen (Martin-Belmonte and Mostov, 2008). Dans ce contexte tridimensionnel, Cdc42 présente une fonction importante au niveau de la polarité apicale (Martin-Belmonte et al., 2007).

Finalement, plusieurs travaux récents ont démontré que le complexe de polarité Par (composé de Par6, aPKC et Par3) joue, avec Cdc42, un rôle concerté pour réguler les mécanismes de trafic des membranes et de polarité cellulaire. Le complexe Par définit le pôle antérieur des embryons de *C. elegans* (Goldstein and Macara, 2007), le domaine apical des neuroblastes chez la drosophile (St Johnston and Ahringer, 2010) et la membrane apicale des cellules épithéliales du nématode (Suzuki and Ohno, 2006) pour mettre en place la polarité apico-basale associée à la formation et la maintenance des jonctions cellule-cellule. Un mécanisme précis fut d'ailleurs décrit chez *Drosophila* où Cdc42, Par6 et aPKC régulent directement l'endocytose aux jonctions adhérentes (Georgiou et al., 2008; Leibfried et al., 2008).

1.2.1.3 Rac

Rac1, Rac2 et Rac3 ont une homologie d'environ 95%. Les différences de séquence entre ces trois protéines explique la différence d'affinité de ces GTPases envers leurs effecteurs. Par exemple, Rac1 a une plus grande affinité que Rac2 pour Pak1 (Knaus et al., 1998). Rac1 et Rac3 sont exprimées ubiquitairement (Moll et al., 1991) alors que Rac2 est spécifiquement exprimée dans les tissus hématopoïétiques (Didsbury et al., 1989).

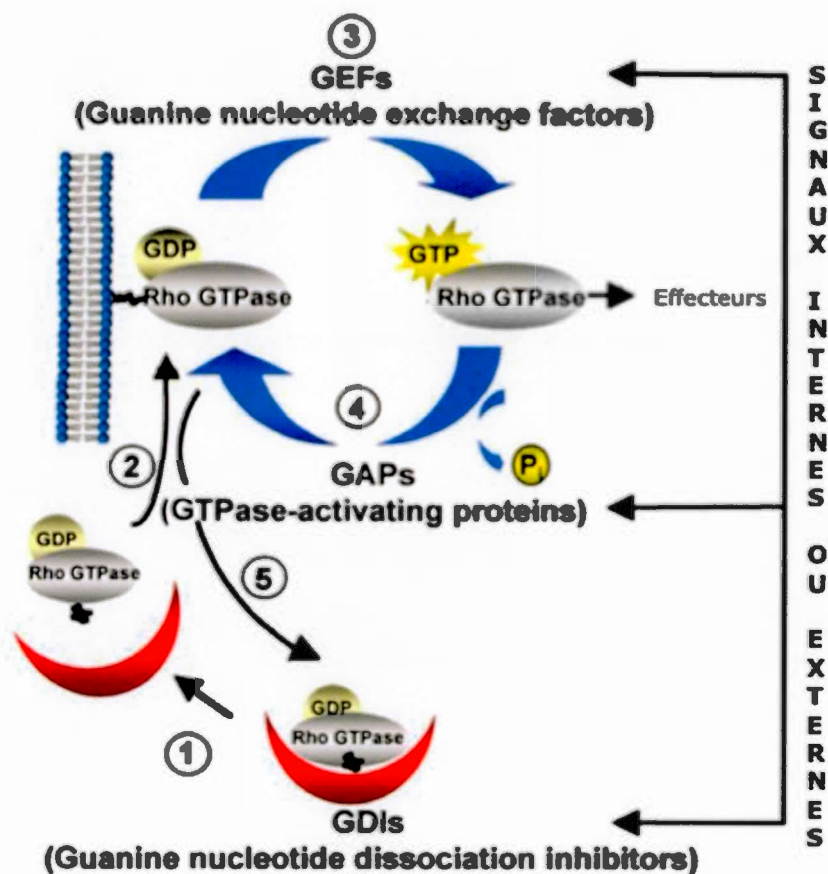
Rac1 est mieux définie que ses homologues. Elle a été décrite comme un régulateur clé du remodelage du cytosquelette d'actine. Le rôle précis de Rac2 est souvent moins facile à définir et serait complémentaire à Rac1. Un bon exemple est lors de l'exocytose des mastocytes, la morphologie cellulaire est sous le contrôle de Rac1 mais Rac2 est requise pour les influx de calcium au niveau de la signalisation (Baier et al., 2014).

1.2.2 Les régulateurs

Comme mentionné précédemment, les Rho GTPases agissent comme des interrupteurs moléculaires, elles cyclent alors entre un état actif (liées au GTP) et un état inactif (liées au GDP), ce cycle est finement régulé à l'aide des protéines agissant comme GEF, GAP et GDI (Figure 7) (Tcherkezian and Lamarche-Vane, 2007). Les Rho GTPases, plus précisément Cdc42, Rac et RhoA, ont donc été liées de très près à la régulation de plusieurs événements tels

que l'exocytose et la formation du complexe exocytique, le remodelage de l'actine et la migration. Pour réguler tous ces processus, les GTPases sont elles-mêmes régulées par des régulateurs spécifiques faisant partis de trois grandes familles de protéines : les GAP (GTPase Activating Protein), les GEF et les GDI (Tcherkezian and Lamarche-Vane, 2007; Van Aelst, and D'Souza-Schorey, 1997).

Figure 7. Cycle des Rho GTPases. Les Rho GTPases cyclent entre un état actif lorsqu'elles sont liées au GTP et un état inactif lorsqu'elles sont liées au GDP en réponse aux signaux reçus de l'environnement. Les GEFs activent les Rho GTPases en échangeant le GDP pour un GTP tandis que les GAP les inactivent en catalysant l'hydrolyse du GTP en GDP. Les GDI, pour leur part, séquestrent les Rho GTPases dans le cytosol sous leur forme inactive.



Adapté de (Tcherkezian and Lamarche-Vane, 2007)

1.2.2.1 GAPs

Les GAPs augmentent l'activité d'hydrolyse du GTP intrinsèque de la GTPase (Jenna and Lamarche-Vane, 2003). Elles sont subdivisées en plusieurs familles et exhibent, en plus de leur domaine GAP, différents domaines tels que des domaines FCH (F-Bin/Ampiphysin), C1 (cystéine-riche), C2 (liaison lipidique calcium-dépendante) etc.

Les GAPs spécifiques pour les GTPases Rho possèdent un domaine GAP dont la structure primaire diffère de celui des GAPs pour les GTPases de la famille Ras (Bax, 1998). Le nombre de RhoGAPs est de 2 à 3 fois plus important que le nombre de Rho GTPases qu'elles régulent. Ceci peut s'expliquer par le fait que les GAPs ont souvent une spécificité tissulaire et des fonctions précises dans ces tissus alors que les GTPases Rho sont, en général, ubiquitaires et multifonctionnelles (Tcherkezian and Lamarche-Vane, 2007). De plus, certaines GAPs sont très spécifiques et catalysent l'activité d'une seule GTPase mais la plupart régulent plusieurs Rho GTPases (Tcherkezian and Lamarche-Vane, 2007). Par contre, il est important de considérer que les études *in vitro* diffèrent souvent des études permettant de mesurer la spécificité de l'activité GAP *in vivo*. Par exemple, p50Rho-GAP a une activité *in vitro* envers Cdc42, Rac1 et RhoA mais a une activité envers RhoA seulement *in vivo* (Ridley et al., 1993).

La fonction des GAPs est régulée par la liaison lipidique aux membranes, les interactions protéine-protéine ou encore la phosphorylation et la dégradation par le protéasome (Ahmed et al., 1993; Jenna et al., 2002; Roof et al., 1998; Su et al., 2003).

1.2.2.2 GEFs

Les GEFs promeuvent l'échange de GDP par un GTP pour activer les GTPases et possèdent des motifs communs les caractérisant. Il est possible de les classer en deux familles : celles qui ont un domaine DH (Dbl-homologie) souvent associé à un domaine PH (pleckstrin homologie) (Cerione and Zheng, 1996; Zheng et al., 1996) ou la seconde famille qui possède un domaine DHR (Dock Homologie Region-2, aussi appelé Docker-ZH2). Chez les mammifères, ces familles comptent respectivement 69 et 11 membres (Meller et al.; Côté and Vuori, 2007).

Le domaine DH a été montré comme étant capable, à lui seul, de catalyser la dissociation du GDP et de la GTPase (Ron et al., 1991). Plusieurs GEFs ayant les domaines DH et PH sont des GEFs pour la famille Rho mais il existe des exceptions telles que la RasGEF, SOS (GEF pour Ras) (Boriack-Sjodin et al., 1998; Margarit et al., 2003). La plupart ont aussi d'autres domaines fonctionnels tels que des domaines SH3 (Src homologie) ou C1 (liaison au diacyl-glycérol). Ces domaines peuvent réguler la fonction GEF de la protéine ou

conférer à la protéine d'autres fonctions biologiques (Cerione and Zheng, 1996).

Tout comme les GAPs, certaines GEFs sont plus spécifiques à une GTPase en particulier tandis que d'autres ont une spécificité beaucoup moins sélective avec une activité envers plusieurs GTPases. Vav, par exemple, connue comme étant une GEF pour Ras, a aussi été montrée comme interagissant avec des membres de la famille Rho (Gulbins et al., 1993; Crespo et al., 1997).

1.2.2.3 GDIs

Les Rho GTPases sont souvent liées aux membranes grâce à leur chaîne lipidique isoprénile de 20 carbones. Dans la plupart des cas, les GTPases sont géranyl-géranylées, parfois elles sont farnesylées, en C-terminal (Olofsson, 1999). Les GDIs, qui portent leur nom du fait qu'elles sont capables d'empêcher la dissociation de GDP lorsqu'il est lié aux GTPases, sont capables d'extraire les GTPases des membranes et forment alors des complexes solubles de Rho GTPases géranyl-géranylées liées au GDP cytosolique (Olofsson, 1999).

Le nombre de GDIs est très inférieur au nombre important de RhoGEFs et RhoGAPs : seulement trois ont été identifiées chez les mammifères et chez les plantes (Nagawa et al., 2010; Garcia-Mata et al., 2011). RhoGDI1, la plus présente chez les mammifères, est exprimée de façon ubiquitaire (Fukumoto et al., 1990; Leonard et

al., 1992) tandis que rhoGDI2 est localisée principalement dans les cellules hématopoïétiques avec une grande spécificité pour Rac1 (Z. Zheng et al., 2015). RhoGDI3 est très peu abondante (Lelias et al., 1993; Gorvel et al., 1998).

Le domaine N-terminal des GDIs est linéaire et change de conformation lorsqu'elles se lient aux GTPases à la membrane; le domaine C-terminal possède quand à lui, le site de liaison géranyl-géranyl (Keep et al., 1997). Cette architecture modulaire leur permet d'interagir avec les GTPases en appliquant un mécanisme en deux temps pour arriver à détacher la GTPase de la membrane (Nomanbhoy et al., 1999; Di-Poi et al., 2001; Dransart et al., 2005). Ce mécanisme pourrait être régulé à son tour par différents acteurs comme des protéines de déplacement ou encore par phosphorylation des GTPases ou des GDIs elles-mêmes. En effet, dans certains cas, la phosphorylation des RhoGDIs augmente l'activation de certaines Rho GTPases (Mehta et al., 2001; DerMardirossian et al., 2004).

À cause de leur mécanisme et de leur implication dans des processus essentiels au maintien cellulaire, les GEFs, les GAPs, les GDIs ainsi que plusieurs effecteurs des Rho GTPases ont été associés au développement de maladies comme le retard mental, les problèmes cardiovasculaires et le cancer (Ramakers, 2000; Sahai and Marshall, 2002; Pacaud et al., 2005).

1.2.3 Les Rho GTPases et la migration collective

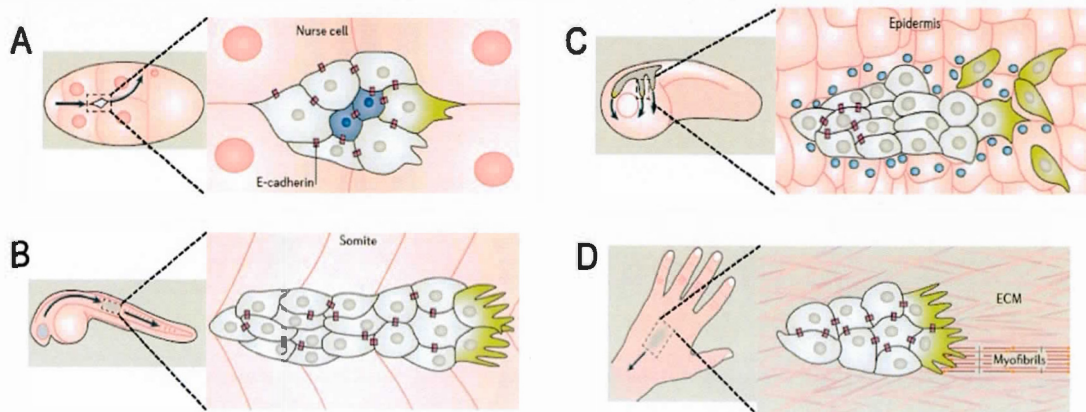
La migration cellulaire est un mécanisme fondamental qui agit pour contrôler le positionnement des cellules, leur devenir et a également des fonctions importantes dans la morphogénèse des organes et organismes, la régénération des tissus et le cancer (Ridley et al., 2003; Friedl and Weigelin, 2008) (Figure 8). Pour y arriver, le corps cellulaire doit se déplacer de façon polarisée. Le déplacement de la cellule dépend de la contraction du système actomyosine qui va propulser les cellules vers l'avant. Il dépend également de la polymérisation de l'actine permettant la formation de protrusion de la membrane plasmique au front meneur (Pollard and Borisy, 2003; Wolf and Friedl, 2009).

La migration collective, consistant en la migration d'une colonie de cellules, utilise les mêmes mécanismes de traction et de propulsion tout en maintenant les jonctions se situant entre les cellules en cours de migration (Etienne-Manneville, 2014). Au sein de cette colonie, les cellules meneuses créent des protrusions à l'avant interagissant et/ou dégradant la matrice extracellulaire tandis que l'arrière et les côtés conservent leurs adhésions cellule-cellule (Khalil and Friedl, 2010). La coordination des cellules implique un mécanisme de mécano-couplage entre cellules meneuses et cellules suiveuses (Khalil and Friedl, 2010; Weber et al., 2012). Dans le cas de cancers de type carcinome, ce sont de tels processus qui sont à l'origine d'une invasion tissulaire importante (Friedl et al., 2012).

Les Rho GTPases sont des régulateurs essentiels à la polymérisation de l'actine, à la contraction des complexes d'actine-myosine, à l'établissement et au maintien de la polarité cellulaire et des jonctions cellulaires (Hall, 1998). Ces dernières relient les signaux reçus de l'extérieur (provenant des adhésions cellulaires, de signaux chimiokines ou de récepteurs tyrosine-kinase) à la dynamique du cytosquelette (Khalil and Friedl, 2010; Ridley, 2011). Elles jouent donc un rôle crucial dans la migration collective.

Figure 8. Migration collective chez *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio* (zebrafish), *Xenopus laevis* et *Homo sapiens*.

Schémas représentant les différents types de migrations collectives : des cellules de bordures lors de l'ovogénèse chez *Drosophila melanogaster* (A), du primordium le long de la ligne latérale chez *Danio rerio* (zebrafish) afin de former des organes mécanosenseur (B), des cellules de la crête neurale de *Xenopus laevis* contribuant à la formation de nombreuses structures de la tête (C) et lors de l'invasion de cellules épithéliales cancéreuses chez l'Humain pour former des métastases (D).



Adapté de (R. Mayor and Etienne-Manneville, 2016)

1.2.3.1 La migration collective chez les mammifères

Dans les cellules en mouvement, trois types de protrusions sont régulées par des Rho GTPases : les filopodes, les lamellipodes et les bulles membranaires (*blebs*).

Les filopodes sont des protrusions fines constituées de filaments parallèles d'actine afin de recevoir des rétroactions de l'environnement (Ridley, 2011). Le tout est contrôlé par Cdc42 *via* mDia2 qui permet la nucléation et l'élongation des filaments d'actine mais également *via* IRSp53 qui assemble les filaments (Ridley, 2011).

Les lamellipodes sont des protrusions plus larges qui permettent une adhésion au substrat et où il y a présence de Rac1, Cdc42, RhoA et RhoC (Machacek et al., 2009). Cdc42 contrôle la polarisation et va promouvoir la formation de protrusions en stabilisant le cytosquelette tandis que Rac régule l'assemblage d'actine et son extension au pôle meneur grâce à WAVE et Arp2/3 (Bravo-Cordero et al., 2013; Etienne-Manneville and Hall, 2001). De plus, dans les fibroblastes, N-WASP est localisé au niveau de groupements d'actine à la membrane plasmique. Il régule la polymérisation des filaments d'actine par Arp2/3 en aval de Cdc42, contribuant à la formation des lamellipodes (Nakagawa et al., 2001).

Un autre type de protrusion est formé au début de la migration collective, les podosomes vont permettre la dégradation de la matrice extracellulaire puis la migration (Ridley, 2011). WASP et N-

WASP participent à la réorganisation du cytosquelette de l'actine de façon Arp2/3-dépendante afin de former ces podosomes (Yamaguchi and Condeelis, 2007).

Enfin, les bulles membranaires sont formées en deux temps en commençant par la formation de la bulle qui va ensuite se stabiliser par le réseau d'actine cortical. Le tout dépend de RhoA et de la contraction de la myosine (Charras et al., 2006) Pinner and Sahai, 2008; Poincloux et al., 2011).

La migration collective des cellules se distinguent de la migration individuelle par le maintien des jonctions entre les cellules migratrices (Ilina and Friedl, 2009) . Les Rho GTPases permettent ce maintien. Les jonctions adhérentes se reforment lorsque les lamellipodes des cellules adjacentes se touchent, c'est lors de ce premier contact que les E-cadhérines initient l'activation de Rac1 *via* la PI3 kinase ainsi que les GEF Vav2 et Tiam1 (Fukuyama et al., 2006). Rac1 va par la suite activer WAVE et Arp2/3 pour l'assemblage du réseau d'actine requis pour l'expansion des jonctions (Yamada and Nelson, 2007). La maturation de ces jonctions est permise par la contraction RhoA/ROCK-dépendante de la myosine aux adhésions cellule-cellule naissantes (Malliri et al., 2004; Yamada and Nelson, 2007).

Au pôle antérieur des cellules en migration, une activité des Rho GTPases est également requise pour les contractions. RhoA active ROCK ce qui va permettre la phosphorylation des chaines légères de myosine et induire la contraction de la myosine II (Vicente-

Manzanares et al., 2009a). RhoA provoque la rétraction des cellules de la partie arrière et permet aussi le maintien de la cohésion des cellules en groupe lors de la migration collective de celles-ci (Vicente-Manzanares et al., 2009b; Anon et al., 2012).

Contrairement aux cellules meneuses qui démontrent une activité très élevée pour RhoA, les cellules suiveuses présentent un niveau réduit d'activation de cette GTPase (Tambe et al., 2011; Reffay et al., 2014). La réduction de l'activation de RhoA entre les cellules meneuses et suiveuses semble nécessaire à la coordination des mécanismes de migration collective (Friedl et al., 2014).

1.2.3.2 La migration collective chez *Drosophila melanogaster*

Chez l'organisme modèle *Drosophila melanogaster*, plusieurs processus morphogéniques peuvent agir comme de bons exemples de migration collective/cohésive. Un de ces processus est la fermeture dorsale lors de laquelle les deux côtés de l'épiderme migrent au-dessus de l'*amnioserosa* et se rejoignent au milieu du côté dorsal pour complètement refermer le trou formé dans les étapes précédentes de l'embryogénèse (Campos-Ortega and Hartenstein, 1985). Le pôle meneur subit une élongation le long de l'axe dorso-ventral vers le pôle ventral (Campos-Ortega and Hartenstein, 1985). Drac1/Rac1 a été décrite comme étant essentiel à ce mécanisme (Woolner et al., 2005) mais toutes les Rho GTPases sont requises dans le processus. Drac1/Rac est nécessaire pour la formation et le maintien du cytosquelette le long

du pôle meneur (Harden et al., 1999). DRhoA/RhoA est, quant à lui, requis dans les cellules flanquantes et Dcdc42/Cdc42 et Ras sont impliquées dans la régulation du cytosquelette au pôle meneur (Harden et al., 1999).

La migration des cellules de bordures (*border cells*) est une autre étape morphogénique modèle pour la migration collective se passant entre les stades 9 et 10 de l'ovogenèse (Laflamme et al., 2012; Montell, 2011). Cette étape contrôlée par des Rho GTPases. RhoA et Cdc42, activeraient la voie de signalisation JNK qui module les contacts cellule-cellules et cellule-substrat pour soutenir la migration (Llense and Martin-Blanco, 2008). La perte de Rac1 inhibe totalement la migration de ces cellules (Murphy and Montell, 1996). Récemment, il fut montré que Rac (Wang et al., 2010) et les mécanismes d'endocytose (Assaker et al., 2010) sont importants pour ce processus. Rac1 est régulée par les GTPases Rab5 et Rab11 (Ramel et al., 2013). Suivant le modèle présentement accepté, Rab5 est nécessaire pour l'activation de Rac tandis que Rab11 serait requise pour la polarisation et l'activité de Rac au pôle meneur de la colonie cellulaire en cours de migration (Ramel et al., 2013). Rab11 régulerait aussi la Moesine, une protéine de la famille ERM qui lie la membrane plasmique au cytosquelette d'actine (Fehon et al., 2010). La Moesine recruterait l'actine en périphérie du groupe de cellules en migration tout en régulant le cytosquelette d'actomyosine et donc la tension corticale (Fehon et al., 2010). Ce processus serait régulé par Rab11. Ainsi, la Moesine et Rab11 contrôleraient la communication entre les cellules lors de migration

collective (Emery and Ramel, 2013). Il est à noter que ces GTPases (Rab5 et Rab11) polarisent l'activité des RTK (Assaker et al., 2010; Laflamme et al., 2012; Ramel et al., 2013).

Enfin, pendant la gastrulation, DRhoA/RhoA via la Myosine II induit une contraction apicale et induit l'invagination des cellules du mésoderme (Barrett et al., 1997; Nikolaidou and Barrett, 2004). Ce dernier est également impliqué dans le contrôle de l'invagination des cellules de la glande salivaire en maintenant la polarité apicale et en produisant des contractions apicales (Xu et al., 2008). C'est également le cas pour Rac1 qui régule la migration des glandes salivaires (Pirraglia et al., 2006).

1.2.3.3 La migration collective chez *Xenopus*

La gastrulation chez *Xenopus* implique plusieurs mouvements cellulaires différents tels que l'intercalation de l'ectoderme, la rotation de l'endoderme, l'involution du mésoderme et la migration des cellules du mésoderme (Keller and Winklbauer, 1992; Winklbauer and Schurfeld, 1999). Les changements dans la mobilité cellulaire, la polarité et les protrusions des cellules postérieures du mésoderme dépendent de la signalisation des Rho GTPases (Tahinci and Symes, 2003). En effet, les Rho GTPases sont impliquées dans l'intercalation du mésoderme postérieur mais les réponses cellulaires de RhoA et de Rac1 diffèrent selon leur état d'activation. Les cellules du mésoderme antérieur, contrairement à celles du postérieur, migrent collectivement sur la matrice

extracellulaire riche en fibronectine et forment des lamellipodes et filopodes au pôle meneur (Keller and Winklbauer, 1992; Ramos and DeSimone, 1996). Dans ces cellules, RhoA et Rac1, avec des rôles spécifiques, contrôlent leur polarité et leur migration dirigée. Ainsi, Rac1 stimulerait la formation des lamellipodes tandis que RhoA serait requis *in vitro* pour la dynamique des lamellipodes et la forme cellulaire mais *in vivo* ne semble pas être nécessaire dans l'embryon (Ren et al., 2006).

RhoA et Rac1 sont aussi activées en aval de Wnt11/Fz7 et Dishevelled dans le mésoderme postérieur (Habas et al., 2001; Habas et al., 2003) afin de contrôler la polarité cellulaire dans le processus (Tahinci and Symes, 2003).

De plus, lors du développement de la crête neurale, Cdc42, Rac1 et RhoA/B contrôlent différents aspects de la spécification et de la migration de ces cellules (Liu and Jessell, 1998; Broders-Bondon et al., 2007; Fuchs et al., 2009) en agissant dans la voie Wnt non-canonique. Cette dernière est impliquée dans la transition épithélio-mésenchymateuse, la polarité, l'adhésion et la migration. En effet, Rac1 promeut la phosphorylation JNK-dépendante et l'accumulation nucléaire de β -caténine tandis que RhoV coopère avec Snai1/Snail pour l'induction de la transcription d'autres acteurs de la voie canonique Wnt (Wu et al., 2008).

1.2.4 Les RHO GTPases et la migration collective chez *C. elegans*

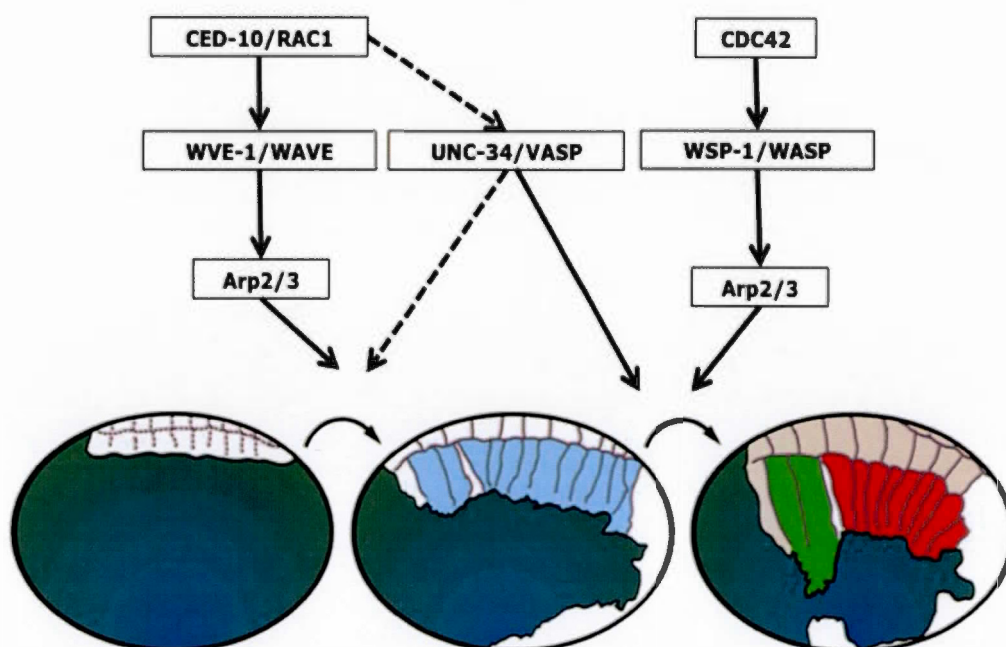
Comme mentionné précédemment, la fermeture ventrale chez *Caenorhabditis elegans* est un bon exemple de migration collective. Le processus implique des Rho GTPases comme régulateurs clés.

Dans un premier temps, les cellules ventrales de l'hypoderme migrent vers la partie ventrale de l'embryon dans un mécanisme dépendant de la Rho GTPase CED-10, homologue *C. elegans* de Rac1 chez les mammifères (Lundquist et al., 2001; Soto et al., 2002). Cette fonction de CED-10 implique l'activation de son effecteur WVE-1/WAVE qui va activer à son tour le complexe de nucléation de l'actine (Arp2/3) provoquant ainsi la migration de l'ensemble des cellules ventrales vers la partie ventrale de l'embryon (Figure 9) (Sawa et al., 2003; Sheffield et al., 2007; Patel et al., 2008).

Suite à cette migration, les cellules meneuses (cellules de l'hypoderme ventral situées dans la partie antérieure de l'embryon) produisent de larges protrusions riches en actine pour compléter la fermeture (Marston and Goldstein, 2006). Ce mécanisme est dépendant de UNC-34/VASP (Withee et al., 2004; Sheffield et al., 2007), un effecteur potentiel de CED-10 et WSP-1/WASP, un effecteur de CDC-42 (Sawa et al., 2003) (Figure 9). L'embryon se ferme complètement par la suite à l'aide d'un mécanisme encore

peu étudié de suture en boucle (*purse-string*) au niveau des cellules de la poche ventrale (*pocket cells*) (Williams-Masson et al., 1997).

Figure 9. Voies de signalisation contrôlant la fermeture ventrale chez *Caenorhabditis elegans*. Les cascades de signalisation connues jusqu'à maintenant menant aux deux étapes successives de la fermeture ventrale. Tout d'abord les cellules ventrales migrent vers le centre de l'embryon dans un mécanisme dépendant de CED-10/WVE-1/Arp2/3 puis les cellules meneuses (en vert) terminent le processus à l'aide d'une voie CDC42/WSP-1 dépendante.



Adapté de (Sheffield et al., 2007)

C'est au cœur de ce processus que RGA-7 (Rho GTPase Activating protein 7), une nouvelle RhoGAP qui a fait l'objet de ma recherche, joue un rôle important.

1.3 RGA-7

Rho GTPase-Activating protein 7, aussi nommé SPV-1 (Spermatheca physiology Variant-1), est une RhoGAP encore peu étudiée chez *Caenorhabditis elegans* (Figure 10). Elle fut impliquée récemment dans la contraction de la spermathèque (Tan and Zaidel-Bar, 2015) ainsi que dans la fermeture ventrale (Ouellette et al., 2015).

Figure 10. Structure protéique de RGA-7/SPV-1. Schéma de la structure protéique de RGA-7. RGA-7 code pour trois transcrits différents (*rga-7l*, *rga-7m* et *rga-7s*) menant tous à des formes protéiques distinctes. Les protéines codées par RGA-7 présentent un domaine F- BAR (FCS (Fes/CIP4 homology)-Bin-Amphiphysin-Rvs), C1 (Cystein-rich) ainsi que RhoGAP bien que la forme courte (*rga-7s*) ne possède pas de domaine F-BAR.



Adapté de (Ouellette et al., 2015)

Chez des *C. elegans* adultes, RGA-7 a aussi été identifiée comme étant une GAP pour RHO-1/RhoA dans la spermathèque (Tan and Zaidel-Bar, 2015). Au niveau moléculaire, chez les mammifères, RhoA a été montrée pour réguler la contraction de l'actomyosine en réponse aux stress mécaniques externes *via* deux effecteurs bien connus et mentionnés précédemment : Dia1 et

ROCK (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996; Watanabe et al., 1999; Smith et al., 2003; Lessey et al., 2012). Chez *C. elegans*, lors de l'ovulation, la spermathèque se dilate à l'arrivée de l'oocyte (Wissmann et al., 1999; Kovacevic and Cram, 2010), RGA-7 agit alors comme un senseur de stress mécanique, en réponse au changement de courbure de la membrane, RGA-7 régule le niveau d'activation de RHO-1 permettant de coordonner le niveau de contraction de la spermathèque au cours de l'expulsion de l'embryon vers l'utérus (Tan and Zaidel-Bar, 2015). En absence de RGA-7, la spermathèque se contracte trop et endommage les embryons. Cette fonction de RGA-7 nécessite son domaine de liaison aux membranes incurvées, le domaine F-Bar (Tan and Zaidel-Bar, 2015).

1.3.1 Domaine F-Bar

Les protéines contenant des domaines F-Bar dans le génome humain sont divisées en neuf sous-familles (Liu et al., 2015). L'homologie de séquence entre les familles est très faible mais leur similarité repose sur la structure du domaine en soi (Aspenstrom, 1997; Lippincott and Li, 2000; Chitu and Stanley, 2007).

Le domaine FCH (FES-CIP4 homology), identifié en étudiant CIP4 (Cdc42-interacting protein 4), est le point commun de toutes les protéines F-Bar (Fricke et al., 2010). En C-terminal de ces protéines, plusieurs domaines peuvent être exprimés tels que des domaines kinases, SH2, SH3 ou encore RhoGAP (Itoh et al., 2005; Tsujita et al., 2006).

La structure cristalline des domaines BAR et N-BAR a révélée qu'ils s'assemblent en dimère en forme de croissant qui se lie aux membranes incurvées via la surface concave de la protéine (Henne et al., 2007). Les domaines F-Bar, pour leur part, sont similaires aux BAR mais les hélices des domaines F-Bar sont plus longues et minces (Frost et al., 2007). Ces structures vont alors se lier à des vésicules de taille différente (Gallop and McMahon, 2005; Henne et al., 2007; Shimada et al., 2007).

Plusieurs protéines F-Bar ont été impliquées dans l'endocytose telles que FBP1/Toca1 et CIP4. Le domaine F-Bar a une affinité particulière pour les liposomes contenant majoritairement des phospholipides et peuvent alors induire la tubulation des membranes *in vitro* et *in vivo* (Kessels and Qualmann, 2004; Itoh et al., 2005; Shimada et al., 2007). En effet, le domaine F-Bar de FBP1/FBP17 est suffisant pour induire des invaginations tubulaires à la membrane lors de l'endocytose (Kamioka et al., 2004).

Les protéines F-Bar sont souvent situées à proximité de la membrane plasmique et l'une des interactions bien caractérisée les impliquant dans l'organisation du cytosquelette est celle avec N-WASP. Chez les mammifères, N-WASP adopte une conformation auto-inhibée qui masque le C-terminal du domaine de liaison au complexe Arp2/3 (Rohatgi et al., 1999; Kim et al., 2000). Cdc42 actif interagit avec Toca1 (une protéine F-Bar) ainsi qu'avec N-WASP, ce qui dissocie le complexe N-WASP-WIP et active N-WASP

(Ho et al., 2004). Ceci entraîne l'assemblage de filaments d'actine et la formation de vésicules d'endocytose clathrine-dépendante (Ho et al., 2004). Un mécanisme similaire a aussi été observé chez la levure (Soulard et al., 2002).

Le domaine de RGA-7 est, quant à lui, formé d'un domaine FCH et d'une région *coiled-coiled* caractéristique d'un domaine F-Bar (Itoh et al., 2005; Tsujita et al., 2006).

1.3.2 Domaine C1

RGA-7 comprend aussi un domaine C1 dans sa structure protéique.

Les domaines C1 sont de petites unités structurales d'environ 50 acides aminés qui ont été découvertes comme module de la protéine kinase C (PKC) (Rahman and Das, 2015). La PKC fait partie d'une famille régulant la prolifération et la différenciation (Nishizuka, 1992; Papp et al., 2004). Les domaines C1 reconnaissent le diacylglycérol (DAG), un messenger secondaire généré à la membrane plasmique en réponse à l'activation des phospholipases C (PLC) et au clivage du phosphoinositide 4,5-biphosphate (PIP2) en DAG (diacylglycérol) et IP3 (inositol triphosphate) (Nishizuka, 1988; Newton, 2004; Parker and Murray-Rust, 2004).

D'autres protéines que la PKC possèdent des domaines C1, comme des kinases (c-Raf), des régulateurs de Rho GTPases (Vav) ou

encore des molécules impliquées dans le relâchement des vésicules des terminaisons synaptiques (Munc13) (Colon-Gonzalez and Kazanietz, 2006). Ces domaines C1 permettent l'adressage des protéines à la membrane en réponse à la production de DAG par la phospholipase C (PLC) (Mosior and Newton, 1995; Hurley et al., 1997). Certaines protéines possèdent des domaines C1 atypiques comme Vav qui ne lie pas les esters de phorbol (Gulbins et al., 1994; Kazanietz, 2002).

Les domaines C1 peuvent agir comme module d'interaction protéique comme la fascine qui a été montrée comme interagissant avec le domaine C1 de PKC α (Anilkumar et al., 2003). En absence de cette interaction, la migration cellulaire est augmentée, suggérant que ce module régule négativement la mobilité cellulaire (Anilkumar et al., 2003). D'autre part, le domaine C1 de la Protéine Kinase D (PKD1) interagit avec le complexe 14-3-3 τ dans les cellules T pour réguler négativement PKD1 (Hausser et al., 1999).

Le domaine C1 de RGA-7 pourrait donc jouer un rôle important dans la régulation de la fermeture ventrale en agissant comme module d'interaction protéique ou de liaison aux membranes.

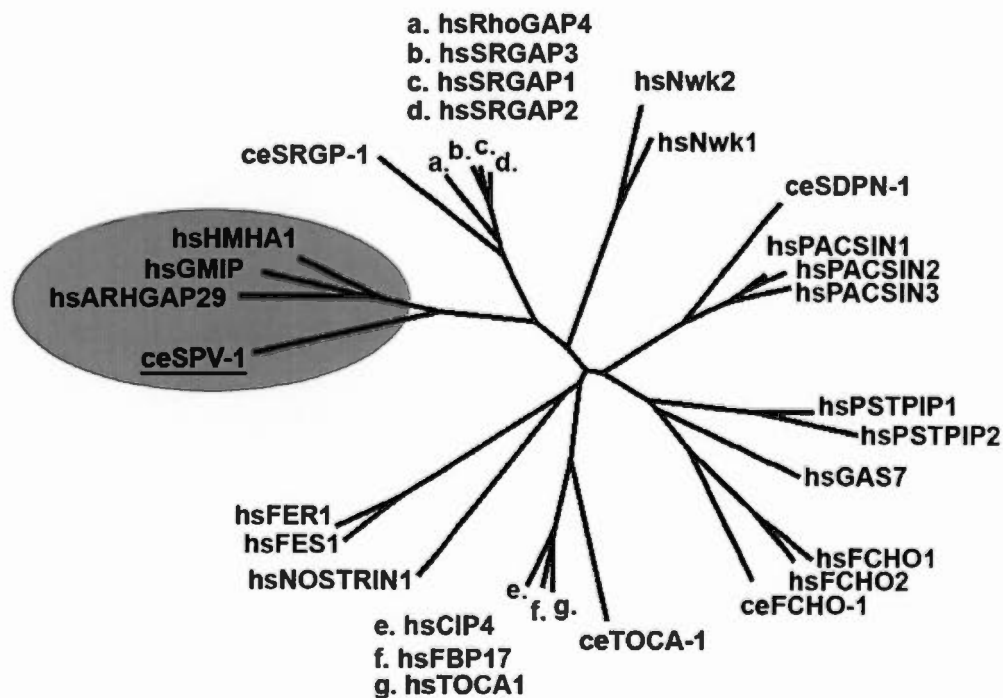
1.4 Potentiels orthologues de RGA-7 chez l'Homme

Des orthologues de RGA-7 existent chez tous les métazoaires allant des éponges jusqu'aux mammifères. Les trois orthologues prédits chez *Homo sapiens* sont ARHGAP29 (Rho

GTPase activating protein 29), aussi connu sous le nom de PARG1, GMIP (GEM interacting protein) et HMHA1/HA-1 (minor histocompatibility protein 1).

Un domaine F-BAR a été prédit pour chacun de ces orthologues potentiels et la phylogénie de ces domaines F-BAR fut récemment décrite (Figure 11) (Tan and Zaidel-Bar, 2015). Cependant, GMIP et PARG1 n'ont pas été proprement caractérisés comme ayant des domaines F-Bar tandis que le domaine BAR de HMHA1 a été décrit récemment (de Kreuk et al., 2013).

Figure 11. Arbre phylogénétique du domaine F-BAR des potentiels orthologues de RGA-7. Arbre phylogénétique sans racine montrant l'homologie de séquence des domaines F-BAR chez *Homo sapiens* (hs) et certains orthologues chez *C. elegans* (ce). RGA-7/SPV-1 forme un groupe distinctif avec ses potentiels orthologues humains (zone grisée).



Adapté de (Tan and Zaidel-Bar, 2015)

1.4.1 PARG1/ArhGAP29

PARG1 (Poly (ADP)-ribose) glycohydrolase 1), aussi nommé ArhGAP29, ayant une homologie de séquence protéique de 27% avec RGA-7 contient un domaine F-Bar prédit ainsi qu'un domaine C1 et RhoGAP (T. U. Consortium, 2015). Il est à noter qu'une analyse d'homologie de domaines montre une homologie de 28% entre les domaines F-Bar ainsi que 32% d'homologie entre les

domaines GAP de PARG1 et RGA-7 (analyse effectuée avec BLAST selon (Altschul et al., 1997)).

Le premier lien reliant RGA-7 à PARG1 vient d'une étude de double hybride chez la levure montrant que PARG1 et RGA-7 interagissent tous les deux avec la GTPase de Rap2 (Myagmar et al., 2005).

Récemment, Rap1 a été montrée comme régulateur de l'activité de RhoA par l'intermédiaire de ArhGAP29/PARG1 (Post et al., 2015a). Rap1 contrôle des mécanismes de dynamique du cytosquelette d'actine comme les adhésions cellulaires (intégrine-cadhérine) en recevant les signaux de ses GEFs Epac1 et PDZ-GEF (Pannekoek et al., 2014). Epac1 répond à l'AMPC et active localement Rap1 à l'origine du réarrangement du cytosquelette d'actine. Rap1 inhibe RhoA, permet le relâchement de l'actine et des fibres de stress et active Cdc42 pour former des regroupements (*bundles*) d'actine aux jonctions des cellules de la barrière endothéliale permettant ainsi le passage contrôlé des cellules immunitaires, des fluides et des solutés (Baluk et al., 2005; Weis, 2008; Ando et al., 2013; Pannekoek et al., 2014). Dans ce contexte, ArhGAP29 interagit avec Radil et Rasip1 (Xu et al., 2011; Ahmed et al., 2012). C'est *via* cette voie que Rap1 réduit les fibres de stress. À travers ce complexe, Rap1 est alors capable de restreindre la signalisation de RhoA qui est essentielle à la potentialisation de la barrière endothéliale (Post et al., 2015a). Le complexe Rasip1/ArhGAP29 contrôle aussi l'étalement cellulaire des cellules épithéliales. En effet, pour qu'il y ait un étalement médié par Rap1, l'activité de

RhoA doit être réduite. C'est alors Rap1, à travers Rasip1 et ArhGAP29, qui réduit l'activité de RhoA, donc la tension induite par l'actomyosine, et ainsi l'étalement (Post et al., 2013; Post et al., 2015b).

Pour sa part, Rap2 existe sous trois isoformes (Rap2A, Rap2B et Rap2C) (Pizon et al., 1988; Ohmstede et al., 1990). Tandis que Epac et PDZ-GEF active Rap1 ainsi que Rap2, RasGEF1 est spécifique à Rap2 (de Rooij et al., 2000; Kuiperij et al., 2003). Rap2 peut aussi se lier au domaine CNH (citron homologie) de MAP4K4 qui est elle-même impliquée dans la fragilisation du cytosquelette d'actine (Taira et al., 2004). C'est à travers ce module, composé de RasGEF1 et MAP4K4, que Rap2 contrôle la barrière endothéliale avec Rap1. La barrière est contrôlée par Rap1 et Rap2 de façon réciproque et la déplétion de Rap2 augmente la résistance de la barrière. Il est à noter que Rap1 peut antagoniser l'effet de Rap2 et ce de façon indépendante à la formation d'actine (Pannekoek et al., 2013).

Il est à noter aussi que MAP4K4 active p38 durant la gastrulation chez la souris pour sous-réguler la E-cadhérine et la matrice extracellulaire concomitante (Zohn et al., 2006).

1.4.2 HMHA1/HA-1

Les antigènes humains mineurs d'histocompatibilité (H) sont importants dans le traitement des leucémies, des tumeurs et des greffes de cellules souches. HMHA1 a été le premier à être identifié et, malgré très peu de résultats publiés pour l'instant, il est le plus

étudié à ce jour (Goulmy et al., 1983; Goulmy, 1996). Sa séquence prédit qu'il code pour une protéine contenant un domaine GAP en C-terminal ainsi qu'un domaine BAR en N-terminal avec un domaine C1 entre les deux (Spierings et al., 2004; de Kreuk et al., 2013). Une homologie de 29% avec RGA-7 a été trouvée suite à une analyse d'homologie de séquence protéique complète. Une analyse d'homologie de domaine décèle, pour sa part, une homologie de 29% entre les deux domaines F-Bar et de 35% pour les domaines GAP (analyse effectuée avec BLAST selon (Altschul et al., 1997)).

De Kreuk et ses collègues montrent qu'en exprimant HMHA1 sans son domaine BAR, l'organisation du cytosquelette d'actine est altérée de façon importante et qu'il est alors possible de voir une perte d'actine et d'adhésions focales (de Kreuk et al., 2013). De plus, ils démontrent que son domaine BAR joue le rôle de domaine régulateur de l'activité GAP de la protéine impliqué dans des mécanismes d'auto-inhibition de la protéine (de Kreuk et al., 2013). HMHA1 exprimé dans des cellules Hela ou Jurkat colocalise et interagit avec les Rho GTPases Rac1 et RhoA *in vivo* et Cdc42 *in vitro*. HMHA1 fut donc montré comme une protéine régulant la migration cellulaire et la dynamique de l'actine (de Kreuk et al., 2013).

Son expression génique se restreint au système hématopoïétique, tout en étant absent des cellules épithéliales saines. Par contre, il est observé dans les cancers épithéliaux (carcinomes) et présenté par les complexes d'histocompatibilité (de Bueger et al., 1992;

Klein et al., 2002). Chez des souris immunodéprimées, des lymphocytes T spécifiques pour l'antigène HA-1 seraient capables de limiter la prolifération de métastases de cancer du sein (Hambach et al., 2006; Hambach et al., 2008). Il s'agit de l'antigène de HMHA1 présenté par les complexes d'histocompatibilité des carcinomes ce qui suggère un rôle de HMHA1 dans la carcinogénèse (Spierings et al., 2004).

1.4.3 GMIP

Gmip (Gem Interacting Protein) est aussi listé comme orthologue potentiel de RGA-7 chez l'Homme. Une analyse de séquence protéique révèle une homologie complète de 25% avec RGA-7 et une analyse d'homologie de domaines révèle 27% d'homologie pour les domaines F-Bar et 32% pour le GAP (analyse effectuée avec BLAST selon (Altschul et al., 1997)). Gmip contient un domaine riche en cystéine (CRD) homologue à un domaine C1, suivi d'un domaine RhoGAP qui a 34% d'homologie avec celui de PARG1. Son domaine RhoGAP est spécifique pour RhoA *in vitro* et régule RhoA *in vivo* (Aresta et al., 2002). GMIP possède aussi un domaine F-Bar prédit en N-terminal mais qui n'a pas été encore étudié (T. U. Consortium, 2015).

Comme son nom l'indique, Gmip interagit avec Gem qui est connu pour réguler le cytosquelette d'actine *via* Gmip et Ezrin (Hatzoglou et al., 2007). L'interaction à la membrane entre GEM et Ezrin est indispensable pour activer Gmip, inactiver localement RhoA et remodeler le cytosquelette d'actine (Aresta et al., 2002).

Gmip et Gem sont aussi impliqués dans la mitose au niveau du remodelage de l'actine et des fuseaux mitotiques avec RhoA (Andrieu et al., 2014). Gem régule, à travers la voie Gmip/RhoA, l'actine corticale et modifie le positionnement du fuseau mitotique pendant les premières étapes de la mitose (Andrieu et al., 2014). En surexprimant Gmip, il est possible d'observer une dépolymérisation de l'actine tandis qu'en sous-exprimant cette protéine, la densité d'actine filamenteux augmente (Andrieu et al., 2014). En interphase, Gmip agit en aval de Gem pour contribuer à la réorganisation du cytosquelette d'actine et du trafic vésiculaire pendant l'élongation des cellules épithéliales en régulant négativement RhoA (Hatzoglou et al., 2007; Johnson et al., 2012; Krey et al., 2013).

Un autre mécanisme important dans lequel Gmip a été impliqué est l'exocytose dans les neutrophiles, qui joue un rôle très important dans la réponse immunitaire et l'inflammation (Johnson et al., 2012). Toujours au niveau du trafic vésiculaire, il a été montré que Gmip interagit avec JFC1, effecteur de Rab27a impliqué dans l'exocytose (McAdara Berkowitz et al., 2001). Cette étude montre qu'il existe un mécanisme de rétroaction mis en place entre la sécrétion des granules et les molécules aidant au remodelage de l'actine.

Les cellules phagocytaires dans lesquelles Gmip est déplété par siRNA montrent des niveaux de polymérisation d'actine plus élevés

avec des protrusions membranaires allongées. Ceci suggère que Gmip joue un rôle important pour le remodelage de l'actine dans les phagocytes (Johnson et al., 2012).

Finalement, Gmip régule la migration neuronale en inhibant RhoA (Ota et al., 2014). Ce processus implique Girdin (*Girders of Actin*), une protéine essentielle à la migration neuronale (Ota et al., 2014). Dans ce système, Gmip contrôle la vitesse de la migration des cellules granulaires, un type d'interneurone olfactif, dans le bulbe olfactif (Ota et al., 2014). Gmip arriverait alors à augmenter la vitesse de migration en augmentant la fréquence des mouvements somatiques tout en réduisant la période de repos (Ota et al., 2014).

1.5 Objectif du projet de maitrise

Le modèle privilégié du laboratoire, le *C. elegans*, nous permet d'étudier plus précisément la fonction des Rho GTPases, leurs régulateurs et effecteurs dans les différentes voies de signalisation contrôlant la morphogénèse des cellules épithéliales.

Mon projet de maitrise consiste à étudier la fonction de RGA-7 au cours de la fermeture ventrale et de l'élongation du nématode *C. elegans*.

CHAPITRE II

Spatial control of active CDC-42 during collective migration of hypodermal cells in *Caenorhabditis elegans*

Marie-Hélène Ouellette, Emmanuel Martin, Germain Lacoste-Caron,
Karim Hamiche and Sarah Jenna

Department of Chemistry, Pharmaqam, Biomed, Université du
Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada

Condensed title: Regulation of CDC-42 during collective migration

AUTHORS CONTRIBUTION

Conception and experimentation design: S.J. and M-H.O.

Experiences: M-H.O., E.M., G.L-C and S.J.

Analysis and interpretation: M-H.O., E. M. and S.J.

Material and reactive preparation: M-H.O, K.H. and G.L-C.

Figures: M-H.O, E.M. and S.J.

Writing: S.J. and M-H.O.

RESUME

La migration collective des cellules épithéliales requiert le maintien des jonctions cellule-cellule tout en favorisant la formation de protrusions riches en actine au pôle meneur des cellules en migration. La fermeture ventrale des embryons de *Caenorhabditis elegans* dépend de la migration collective des cellules meneuses de l'hypoderme vers le centre de l'embryon où elles forment de nouvelles jonctions avec les cellules contralatérales voisines. Dans cette étude, nous caractérisons la fonction embryonnaire de RGA-7/SPV-1, une RhoGAP spécifique à CDC-42/Cdc42 et RHO-1/RhoA, qui contrôle la formation de protrusions riches en actine au pôle meneur des cellules meneuses de l'hypoderme et la formation de nouvelles jonctions entre les cellules contralatérales. Nous montrons que RGA-7 contrôle ces processus de façon antagoniste à WSP-1/N-WASP, un effecteur de CDC-42, et des protéines de liaison à CDC-42 TOCA-1/2/TOCA1. RGA-7 est recrutée à des localisations spatiales distinctes aux jonctions entre cellules meneuses adjacentes où elle va promouvoir l'accumulation des clusters de CDC-42 actifs. RGA-7 inhibe aussi l'étalement de ces clusters vers le pôle meneur des jonctions et régule leur accumulation ainsi que leur distribution aux nouvelles jonctions qui se forment entre les cellules meneuses contralatérales. Notre étude suggère que RGA-7 contrôle la migration collective et la formation des jonctions entre les cellules épithéliales en restreignant spatialement CDC-42 actif au niveau des jonctions cellule-cellule.

ABSTRACT

Collective epithelial cell migration requires the maintenance of cell-cell junctions while enabling the generation of actin-rich protrusions at the leading edge of migrating cells. Ventral enclosure of *Caenorhabditis elegans* embryos depends on the collective migration of anterior positioned leading hypodermal cells towards the ventral midline where they form new junctions with their contralateral neighbours. In this study, we characterized the zygotic function of RGA-7/SPV-1, a CDC-42/Cdc42 and RHO-1/RhoA-specific Rho GTPase-Activating Protein, which controls the formation of actin-rich protrusions at the leading edge of leading hypodermal cells and the formation of new junctions between contralateral cells. We show that RGA-7 controls these processes in an antagonistic manner with the CDC-42 effector WSP-1/N-WASP and the CDC-42-binding proteins TOCA-1/2/TOCA1. RGA-7 is recruited to spatially distinct locations at junctions between adjacent leading cells, where it promotes the accumulation of clusters of activated CDC-42. It also inhibits the spreading of these clusters towards the leading edge of the junctions and regulates their accumulation and distribution at new junctions formed between contralateral leading cells. Our study suggests that RGA-7 controls collective migration and junction formation between epithelial cells by spatially restricting active CDC-42 within cell-cell junctions.

INTRODUCTION

Collective migration of epithelial cells is characterized by maintaining cell-cell adhesion whilst creating an antero-posterior polarity essential for directional migration (Khursheed and Bashyam, 2014). It plays an important role in organ morphogenesis, tissue regeneration and tumour dissemination (Friedl and Gilmour, 2009). Collective migration is also required for dorsal and ventral enclosure in *Drosophila melanogaster* (Bastock and Strutt, 2007) and *Caenorhabditis elegans*, respectively (Chisholm and Hardin, 2005a).

The late phase of *C. elegans* embryonic development includes epidermal morphogenic events that enable the embryo to acquire its final tubular shape (Chisholm and Hardin, 2005a). One of these events, termed ventral enclosure, involves the migration of ventral hypodermal cells towards the ventral midline to cover the embryo in an epidermal layer. This event occurs in two phases. In the first phase, the anterior ventral hypodermal cells - referred to as the leading cells, migrate towards the ventral midline using large actin-rich protrusions, where they form junctions with their contralateral neighbours (Chisholm and Hardin, 2005a). Afterwards, the posterior ventral hypodermal cells, called the pocket cells, migrate towards the ventral midline using a contraction-dependent, purse-string mechanism, which is still poorly described (Williams-Masson et al., 1997). These migratory mechanisms are supported by signals from underlying neuroblasts (Chisholm and Hardin, 2005a).

During ventral enclosure, Rho GTPases control hypodermal cell migration in a cell-autonomous manner. Rho GTPases are molecular switches controlling a wide-range of cellular functions including shape changes and cell migration (Takai et al., 2001). They cycle between an "ON" GTP-bound form, during which they interact with specific effectors, and an "OFF" GDP-bound form. They are regulated by Guanine nucleotide-Exchange Factors (GEFs) and GTPase-Activating Proteins (GAPs). The Rho GTPase CED-10/Rac1 regulates early migration of leading and pocket cells during ventral enclosure through the activation of effectors, including GEX-1/WVE-1/Scar and the ARP2/3 complex to promote remodelling of the actin cytoskeleton (Lundquist et al., 2001; Withee et al., 2004). An additional pathway involving another potential effector of CED-10, the ENA/VASP UNC-34, was shown to specifically control the protrusive activity of leading cells in parallel with the CDC-42-effector WSP-1/N-WASP/WASp (Withee et al., 2004; Sheffield et al., 2007). In mammals, regulation of actin cytoskeleton remodelling and membrane trafficking by N-WASP/WASp and Cdc42 has been shown to depend on the F-BAR proteins TOCA1/FBP17 (Pichot et al., 2010). While CDC-42 has not been directly studied in *C. elegans* ventral enclosure, the two redundant homologs of TOCA1, *toca-1* and *toca-2* were shown to control endocytosis of junctional proteins at that stage together with WSP-1 (Chiara Giuliani et al., 2009a). Another Rho GTPase, RHO-1/RhoA and its effector LET-502/ROCK may also control myosin-dependent contraction events during ventral enclosure (Fotopoulos et al., 2013).

Coordinating the different Rho GTPases and generating spatially distinct active zones at the leading edge of migrating fibroblasts is required for the generation of actin-rich protrusions (Pertz, 2010). Spatially controlling the activity of the different Rho GTPases at cell-cell junctions is important for the transmission of forces from the leading cells to those that follow (Friedl et al., 2014a) and for the maintenance of cell-cell junction integrity (Hidalgo-Carcedo et al., 2011). Antagonism between Cdc42 and RhoA at cell-cell junctions reduces actomyosin contractility between collectively migrating cells, which enables better coordination of their movement (Hidalgo-Carcedo et al., 2011). In collectively migrating MDCK cells, active RhoA is found at the front of the leading cell(s), while active Cdc42 is restricted to more posterior/back locations (Reffay et al., 2014). Similarly, spatially distinct concentric zones of active RhoA and Cdc42 form in *Xenopus* oocytes during wound-healing (Benink and Bement, 2005). This suggests that the spatial restriction of active Rho GTPases is evolutionary conserved and important for collective migration.

Signalling mechanisms spatially controlling active Cdc42 have been described in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (H.-O. Park and Bi, 2007). The clustering of active Cdc42 at the bud site involves exocytic mechanisms targeting Cdc42 from intracellular compartments to the plasma membrane. It also involves feed-forward loops in which active Cdc42 controls exocytic mechanisms promoting its own accumulation and activation by GEFs at forming clusters (Harris and Tepass, 2010). The spatial restriction of active Cdc42 also involves actin-dependent endocytosis, and the

recruitment of Rho GAPs to the bud site (H.-O. Park and Bi, 2007; C.-F. Wu and Lew, 2013). These studies highlight the interdependence of the spatial regulation of active Cdc42 and membrane trafficking, and the critical role for Cdc42-specific GAPs and GEFs in these processes in yeast.

In the epithelia of multicellular organisms, the mechanisms controlling the spatial distribution of active Cdc42 are less well understood. Membrane trafficking was however shown to spatially control the targeting of active Cdc42 at the leading edge of migrating primary rat astrocytes (Osmani et al., 2010). The function of Cdc42 in regulating actin-dependent endocytosis together with the F-BAR protein TOCA1/FBP17 and N-WASP/WSP-1 and endocytic recycling events at cell junctions is also well established in multicellular organisms (Andrea Leibfried et al., 2008a; Chiara Giuliani et al., 2009a; Bu et al., 2010; Harris and Tepass, 2010). Whether regulation of membrane trafficking by Cdc42 contributes to the spatial regulation of its active zone at the junctions between epithelial cells is, to date, unknown. Feed-forward loops involving N-WASP/WASp and Cdc-42-specific GEFs (Hussain et al., 2001; Kovacs et al., 2011; Humphries et al., 2014), as well as feedback mechanisms involving recruitment of Rho GAPs to prevent excessive activation of Cdc42 at cell-cell junctions were also described in the epithelia of multicellular organisms (Elbediwy et al., 2012). However, whether these mechanisms spatially control active Cdc42 at cell junctions and collective migration of epithelial cells is also still unknown.

In this study, we characterized the function of the Rho GTPase-Activating Protein 7 (*rga-7*) during *C. elegans* ventral enclosure. This gene, called also *spv-1* (Spermatheca variant 1), encodes a protein containing a RhoGAP domain, an F-BAR domain that interacts with curved membranes, and a C1 domain that may interact with diacylglycerol (DAG) (Pei Y. Tan and Zaidel-Bar, 2015b). RGA-7/SPV-1 was previously shown to regulate the activity of RHO-1/RhoA in the spermatheca during expulsion of embryos towards the uterus, and has three close human homologs: GMIP, ARHGAP29/PARG1 and HMHA1 (Pei Y. Tan and Zaidel-Bar, 2015b). We show here that RGA-7 displays GAP activity towards CDC-42 in addition to RHO-1/RhoA. RGA-7 is required for migration of leading cells towards the ventral midline and to regulate the dynamics of junction formation between contralateral leading cells. We also show that RGA-7 functions in parallel with LET-502/ROCK and antagonistically with WSP-1/N-WASP and TOCA-1/2/TOCA1/FBP17. RGA-7 regulates the accumulation and distribution of active CDC-42 clusters at the junctions between adjacent leading cells and between contralateral leading cells. Our data suggest that spatial regulation of active CDC-42 at the cell-cell junctions by RGA-7 plays an important role in the ability of leading cells to migrate collectively towards the ventral midline and also regulates junction expansion between contralateral cells.

RESULTS

RGA-7 is expressed in the hypodermis and controls ventral enclosure in a cell autonomous manner

To gain a better understanding of the regulation of Rho GTPases during ventral enclosure, we searched for available strains carrying mutations in genes encoding for Rho GTPase regulators and displaying ventral enclosure defects. We obtained a strain carrying a 577 bp deletion within *rga-7* from the *C. elegans* genetic center (CGC), that was previously described as a loss-of-function mutation (Pei Y. Tan and Zaidel-Bar, 2015b) (Fig. S1 A). We observed that *rga-7(ok1498)* hermaphrodites laid $27.9 \% \pm 3.5$ SEM dead embryos (N =227; Fig. 12 A). Imaging *rga-7(ok1498)* embryonic development revealed that 62.9% (34 out of 54) of embryos displayed morphogenic problems during late embryogenesis: 9.3% (5 out of 54) of the embryos arrested their development during ventral enclosure (Fig. 12 B, D and Video 1); 11.1% (6 out of 54) arrested during elongation (arrow; Fig. 12 B, E and Video 2); and 37%, (20 out of 54) displayed slow ventral enclosure – defined as ventral enclosure that lasted for more than 1 hour at 25°C - but hatched and developed into adults (Fig. 12 B). A small proportion of embryos arrested before morphogenesis (7.4%; 4 out of 54; Fig. 12B) and 3.7%, (2 out of 54) displayed spherical eggshells and died at various stages of embryonic development (Egg-shells defects; Fig. 12 B). Finally, 31.5% (17 out of 54) developed normally into adults and did not display any of the above phenotypes.

We crossed *rga-7(ok1498)* hermaphrodites with wild-type (*wt*) males and found that the ventral enclosure defects observed in *rga-7* mutant embryos are due to zygotic requirements for the gene (see supplementary data; Fig. S1 B). We also tested whether *rga-7* loss-of-function was responsible for the embryonic lethality (Emb) phenotype observed in *ok1498* carrying animals using rescue experiments. To do so, we characterized the molecular structure and expression of *rga-7* in embryos (see supplementary data; Fig. S1 A; C and D). This revealed that *rga-7* codes for three transcripts with the two larger ones, *rga-7l* and *rga-7m* detected in embryos (see supplementary data; Fig. S1 A; C and D). We then generated transgenic animals carrying *sajIs22[rga-7p::rga-7::GFP; unc-119R]*, driving the expression of a fusion protein between RGA-7 and the green-fluorescent protein (GFP) under the control of the *rga-7p* endogenous promoter (Fig. S2 A, see methods). RGA-7::GFP was detectable in several cells of the embryo during ventral enclosure where it accumulated as perinuclear punctate structures (Fig. 12 H). RGA-7::GFP was more tubular during early elongation (arrow; Fig. 12 I). During late elongation, it was mainly expressed in the dorsal and ventral hypodermal cells where it organized itself into stripes reminiscent of filamentous actin bundles (Chisholm and Hardin, 2005a) (Fig. 12 J). RGA-7::GFP was also expressed in a wide-range of cells in larvae and adults including the hypodermis, head and tail neurons and spermatheca (Fig. S2 B-D respectively). Embryos expressing *sajIs22* did not present any significant Emb and no significant delay during ventral enclosure compared to *wild-type* (*wt*) embryos (Fig. 12 A and B). When expressed in *rga-*

7(ok1498) hermaphrodites, this transgene fully rescued *rga-7(ok1498)*-associated Emb and ventral enclosure defects (Fig. 12 A, B and F). Our results suggest that the mutation in *rga-7(ok1498)* is responsible for the ventral enclosure defects observed in the mutant strain and that *sajIs22* expresses functional RGA-7 protein.

Ventral enclosure defects arise in embryos carrying mutations in genes required either in the hypodermis for their migration, or in the underlying neuroblasts (Chisholm and Hardin, 2005a). To assess if *rga-7* is required in the hypodermis during ventral enclosure, we generated transgenic animals expressing RGA-7::GFP under the control of the hypodermal specific promoter *lin-26p* (*sajIs20[lin-26p::rga-7::GFP; unc-119R]*; Fig. S2 A). *rga-7(ok1498)* mutant embryos expressing this transgene did not display any Emb phenotypes or ventral enclosure defects (Fig. 12 A, B, G and Video 3), suggesting that *rga-7*'s function is required in the hypodermal cells during ventral enclosure.

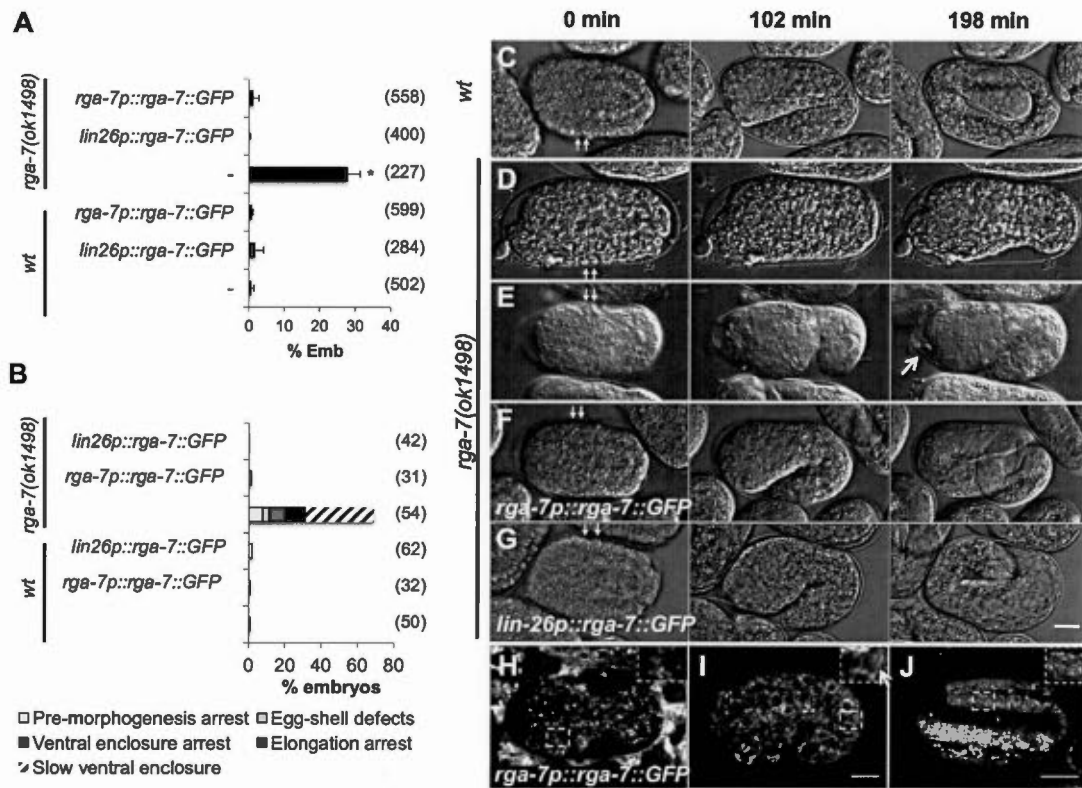


Figure 12. *rga-7* controls ventral enclosure. (A) Percentage of Embryonic lethality (Emb) is measured for each indicated genotypes (B) Percentages of embryonic defects are indicated for each genotype. (C-G) Embryonic development progress for *wt* (C), *rga-7(ok1498)* (D-E), *rga-7(ok1498);sajIs22[rga-7p::rga-7::GFP]* (F) and *rga-7(ok1498);sajIs20[lin26p::rga-7::GFP]* (G). Time = 0 min corresponds to the time when leading cells start to be observable ventrally (arrows). Expression pattern of RGA-7::GFP in *sajIs22[rga-7p::rga-7::GFP]* animals during ventral enclosure (H); early elongation (I) and late elongation (J). Arrow in (I) indicates tubular structures enriched in RGA-7::GFP. Scale bar = 10 μ m.

RGA-7 is a GAP for CDC-42 and RHO-1 and controls ventral enclosure in an antagonistic manner with WSP-1/N-WASP/WASp and in parallel with LET-502/ROCK.

RGA-7 contains a RhoGAP domain that may play an important role during ventral enclosure. To assess the specificity of RGA-7 GAP activity, we tested the ability of the recombinant RhoGAP domain of RGA-7 to catalyze the GTPase activity of the six Rho GTPases identified in the *C. elegans* genome (Fig. 13 A; see Methods). We found that the RGA-7 GAP domain had significant GAP activity towards CDC-42 and, to a lesser extent (~10X less), towards RHO-1/RhoA but it did not have any significant GAP activity towards the other GTPases tested (Fig. 13 A). We then assessed if RGA-7 regulates CDC-42 and/or RHO-1 during ventral enclosure. Maternal disruption of *cdc-42* and *rho-1* causes defects during early embryogenesis due to their requirement for cell polarity and/or cytokinesis (Kumfer et al., 2010). Therefore, we assessed the requirement for RGA-7 function during ventral enclosure by monitoring genetic interactions between *rga-7(ok1498)* and mutants of CDC-42 and RHO-1-specific effectors shown to control ventral enclosure: WSP-1/N-WASP/WASp and LET-502/ROCK (Sawa et al., 2003; Sawa and Takenawa, 2006; Fotopoulos et al., 2013). *wsp-1(gm324)* and *let-502(sb118ts)* alleles have been described as null and/or strong loss-of-function alleles at 20°C and 25.5°C respectively (Withee et al., 2004; Lin et al., 2012). Embryos carrying *wsp-1(gm324)* displayed slow ventral enclosure, ventral enclosure arrest and arrest during early elongation with internal cells extruding from the embryos as observed by DIC microscopy

(Fig. 13 B, D-F and Video 4). As expected, in light of the known functions of *let-502* during early embryogenesis, ventral enclosure and elongation (A. J. Piekny et al., 2000), 25% of embryos carrying the *let-502(sb118ts)* and grown at 25.5°C arrested their development during ventral enclosure and 70.6% (9 out of 12) displayed slow ventral enclosure defects and arrested as non-elongated larvae (Fig. 13 B; Video 5). Interestingly, *rga-7(ok1498); wsp-1(gm324)* developed normally with no visible ventral enclosure defects (Fig. 13 B, G and Video 6). On the other hand, our results show that *let-502(sb118ts)* is synergistic with *rga-7(ok1498)*; double mutant embryos at 25.5°C were 80,4% Emb (N = 51) with 25.5% of embryos arresting at an early stage of ventral enclosure, 41.2% arresting during early elongation with internal cells extruding from the embryos (Fig. 13 B, H, I and Video 7) and 13.7% dying at pre-morphogenic stages (Fig. 13 B). These data suggest that *rga-7* functions antagonistically with *wsp-1* and in parallel with *let-502* during ventral enclosure. These data also support the hypothesis that *rga-7* may function in the *cdc-42/wsp-1* pathway and in parallel with *rho-1/let-502*(ROCK) during ventral enclosure. The fact that *rga-7* and *wsp-1* mutants display similar ventral enclosure defects and mutually rescue each other is intriguing.

N-WASP/WASp was shown in several systems to be involved in feed-forward loops promoting Cdc42 activation by GEFs (Hussain et al., 2001; Kovacs et al., 2011; Humphries et al., 2014). In light of this, we hypothesize that during ventral enclosure, WSP-1 and RGA-7 control CDC-42 activation and inactivation, respectively.

Following this hypothesis, the balance of CDC-42 cycling and consequently its function may be restored in the *rga-7;wsp-1* double mutant, although it would be reduced compared to *wt*.

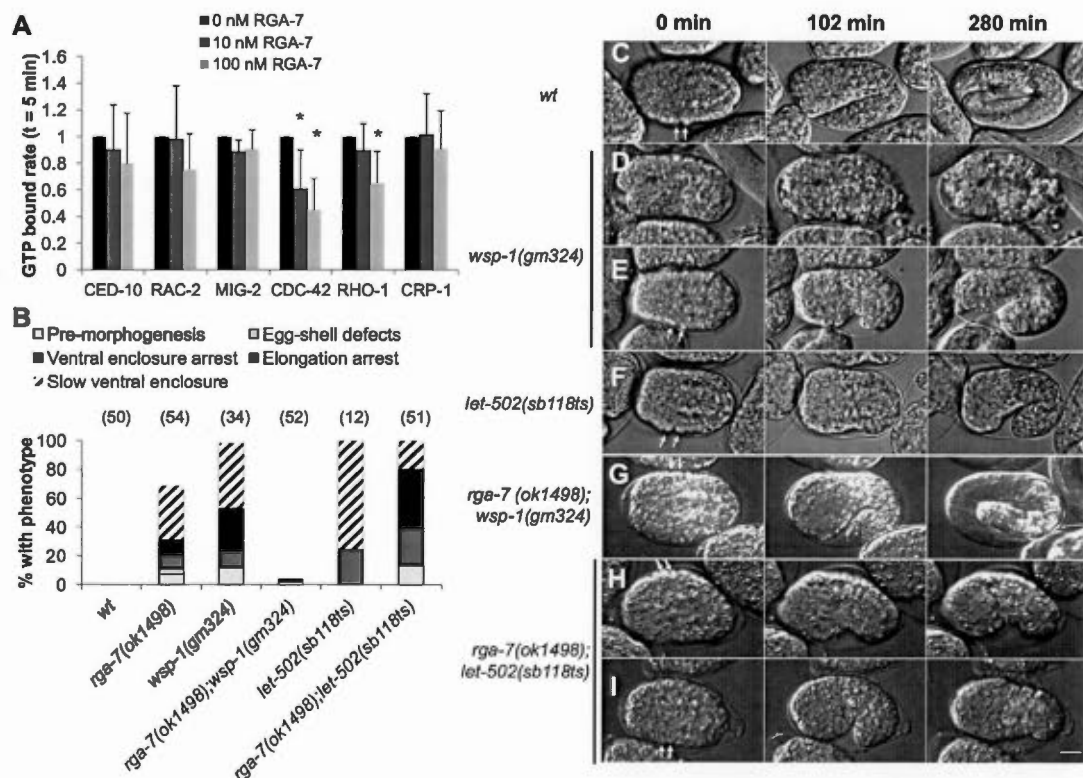


Figure 13. RGA-7 is a GAP for CDC-42 and RHO-1 and controls ventral enclosure in an antagonistic manner with WSP-1 and in parallel with LET-502. (A) The rate of GTP remaining bound on recombinant GTPases after 5 min incubation in presence of 10 or 100 nM of recombinant GAP domain of RGA-7 compared to control (0nM RGA-7) is indicated. (B) Percentages of embryonic defects for indicated genotypes. Phenotypes indicated by different shades of grey are associated to embryonic lethality (C-I) Embryonic development progress from time = 0 min corresponding to the time when leading cells start to be observable ventrally (Arrows), for *wt* (C), *wsp-1(gm324)* (D-E), *let-502(sb118ts)* at 25.5°C (F), *rga-7(ok1498);wsp-1(gm324)* (G) and *rga-7(ok1498);let-*

502(*sb118ts*) at 25.5°C (H-I). Scale bar = 10 μ m. * T-test *P*-value < 0.05

RGA-7 controls the formation of actin-rich protrusions at the leading edge of leading cells

To gain a better understanding of the cellular function of *rga-7*, we assessed if it controls the formation of actin-rich protrusions at the leading edge of leading cells during ventral enclosure, as demonstrated for *wsp-1* (Sawa et al., 2003). To do so, we expressed the filamentous actin-binding probe *lin-26p::VAB-10(ABD)::GFP* in hypodermal cells of *wt* (Video 8) or mutant animals (Video 9 and Video 10) and measured the size of protrusions in leading (LCs; anterior – Figure 14I) and pocket cells (PCs; posterior – Fig. 14 I) as previously described (Sheffield et al., 2007). Briefly, the length of the protrusions formed by the LCs (red thick line; Figure 14 A-I) was measured, as well as the width of these cells (Fig. 14 I). The protrusion rate of leading cells was then calculated as the length of protrusions versus the width of these cells. Similar measurements were made for the pocket cells. Both *wsp-1(gm324)* and *rga-7(ok1498)* embryos displayed a significant reduction in the LC protrusion rate compared to *wt* embryos, (t-test *P*-values = 10^{-11} and 10^{-14} respectively; compare Fig. 14 A with B and C; Fig. 14 J), but did not display any change in their PC protrusion rates (Fig. 14 K). Double *rga-7(ok1498); wsp-1(gm324)* mutant embryos displayed a significantly increased protrusion rate for the LCs compared to *rga-7(ok1498)* and *wsp-1(gm324)* animals

(t-test P -values = 10^{-8} and 10^{-12} respectively; Fig. 14 J), though still significantly lower compared to *wt* embryos (t-test P -value = 0.002; Fig. 14 J). In addition, while *rga-7(ok1498); wsp-1(gm324)* embryos enclosed faster than single mutants (compare Fig. 14 D to B and C), they were still delayed when compared to *wt* embryos (compare Fig. 14 D to A). These data suggest that *rga-7* and *wsp-1* control the formation of actin-rich protrusions in the LCs in an antagonistic manner. In addition, the loss of both *rga-7* and *wsp-1* function only partially restored the ability of the LCs to form actin-rich protrusions and to migrate towards the ventral midline.

Since RGA-7 may negatively regulate CDC-42 activity during ventral enclosure, and WSP-1 activity may depend on active CDC-42 and/or promote its activation, we propose that the misregulation of CDC-42 activity should cause ventral enclosure defects similar to those seen in *rga-7(ok1498)* and *wsp-1(gm324)* embryos. Over-expressing CFP::CDC-42 in the hypodermal cells using the *lin-26p* promoter triggered a significant reduction in the protrusion rate of LCs (t-test P -value = 10^{-6} ; Fig. 14 J), while causing a significant increase in the PC protrusion rate when compared to *wt* embryos (t-test P -value = 10^{-6} ; Fig. 14 K). Moreover, CFP::CDC-42 expressing embryos had delayed ventral enclosure compared to *wt* embryos (compare Fig. 14 E and A) and 72.2% of them (13 out of 15 embryos) failed to complete ventral enclosure. Interestingly, over-expression of CFP::RHO-1 in the hypodermal cells did not significantly alter the LC protrusion rate (Fig. 14 F and J), but significantly increased the PC protrusion rate (t-test P -value = 10^{-11} ; Fig. 14 K). Moreover, the LCs of the CFP::RHO-1 embryos

migrated in a similar manner as in *wt* embryos, while the PCs were delayed (compare Fig. 14 F and A). Supporting the predominant role of CDC-42 regulation over that of RHO-1 during LC migration, the average intensity of over-expressed CFP::*RHO-1* was approximately 1.67-fold as high as CFP::*CDC-42* (Fig. S3 A). These data suggest that misregulation of CDC-42, but not of RHO-1, may be responsible for the reduced protrusion rate of LCs in *rga-7(ok1498)* embryos.

The F-BAR proteins TOCA1/FBP17 and their orthologs in *C. elegans* TOCA-1 and TOCA-2, control actin cytoskeleton remodelling and membrane trafficking together with WSP-1/N-WASP/WASp and CDC-42 (Pichot et al., 2010). We then assessed whether *rga-7* may antagonize *toca-1/2* functions during ventral enclosure, similar to *wsp-1*. To do so, we submitted *rga-7(ok1498)* and *wt* animals expressing VAB-10(ABD)::GFP to RNAi against *toca-1* and *toca-2* and measured the protrusion rate of LCs and PCs during ventral enclosure. *toca-1/2(RNAi)* embryos did not display any change in their LC protrusion rate relative to *wt* embryos (Fig. 14 J), but the protrusion rate of the PCs was significantly higher (t-test *P-value* = 0.0009; Fig. 14 K). However, the protrusion rate of the LCs was significantly increased in *rga-7(ok1498); toca-1/toca-2(RNAi)* compared to *rga-7(ok1498)* animals (t-test *P-value* = 0.006; Fig. 14 J). These data suggest that *rga-7* controls the formation of actin-rich protrusions in the leading cells in an antagonistic manner with *wsp-1* and *toca-1/2*, possibly by regulating CDC-42 activity. In addition, in the absence of both *rga-7* and *wsp-1/toca-1/2*, a parallel pathway drives the formation of actin-rich protrusions in

the LCs, which is slightly less efficient than the *rga-7/wsp-1* pathway(s).

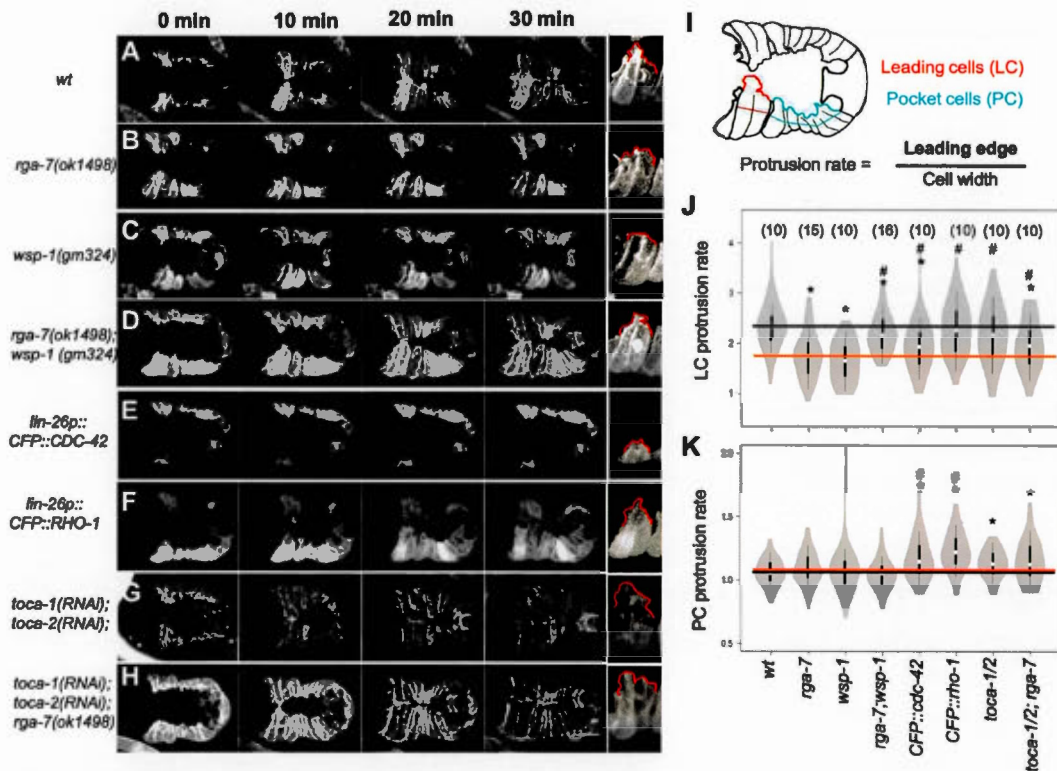


Figure 14. *rga-7* controls the protrusive activity of leading cells during ventral enclosure. Time-lapse confocal microscopy of ventral enclosure in *wt* (A), and indicated genotypes (B-H). Except *lin26p::CFP::CDC-42* (E) and *lin26p::CFP::RHO-1* (F), all strains expressed a *lin-26p::VAB-10(ABD)::GFP* transgene. The protrusion measured to calculate the protrusion rate are indicated by a red line in the right panel of each time course (red line). Scale bar = 10 μm . (I) Schematic representation of an embryo indicating measured protrusions (thick line) and cell width (thin lines) for leading cells (red) and pocket cells (blue) (J-K). Violin plots representing the distribution of protrusion rate for leading cells (LC; J) and pocket cells (PC; K) for animals of

indicated genotypes. Black and orange lines represent average protrusion rate for *wt* and *rga-7(ok1498)* embryos respectively. Number of quantified embryos is indicated for each genotype. * T-test vs *wt* *P*-value < 0.001, # T-test vs *rga-7(ok1498)* *P*-value < 0.02.

RGA-7::GFP is recruited to cell-cell junctions

To better understand the molecular function of RGA-7 in leading cells during ventral enclosure, we assessed its subcellular location in these cells. To do so, we used embryos expressing RGA-7::GFP and the actin-binding probe VAB-10(ABD)::mCherry under the control of the hypodermal promoter *lin-26p* (Fig. 15). As observed in transgenic animals expressing RGA-7::GFP under the control of its own promoter (Fig. 15 H), the fusion protein was found mainly at punctate and tubular structures within the cytosol of ventral hypodermal cells during ventral enclosure (Fig. 15). It was also excluded from the actin-rich protrusions observed at the leading edges of both leading and pocket cells (orange line; Fig. 15 A and B). We measured RGA-7::GFP intensity along the junction located between adjacent leading cells (dashed arrow; Fig. 15 C), and identified two subdomains: the distal junction located within 4 μ m from the edge of the junction (light blue line; Fig. 15 A) and the proximal junction located between 4 and 7 μ m from this edge (dark blue line; Fig. 15 A). RGA-7::GFP was excluded from distal junctions (Fig. 15 C) and was found to form clusters with variable intensities along the proximal junction (Fig. 15 C). During the later stages of ventral enclosure, we measured the levels of RGA-7::GFP

at new junctions that form and expand between contralateral neighbouring cells (red line; Fig. 15 A). RGA-7::GFP was excluded from expanding junctions immediately after collision of contralateral cells (Fig. 15 D and F) and was found to form clusters with variable intensities along the junction in fully enclosed embryos (Fig. 15 E and G). These data suggest that RGA-7::GFP is recruited to proximal junctions between adjacent leading cells and at a late stage of junction formation between contralateral cells.

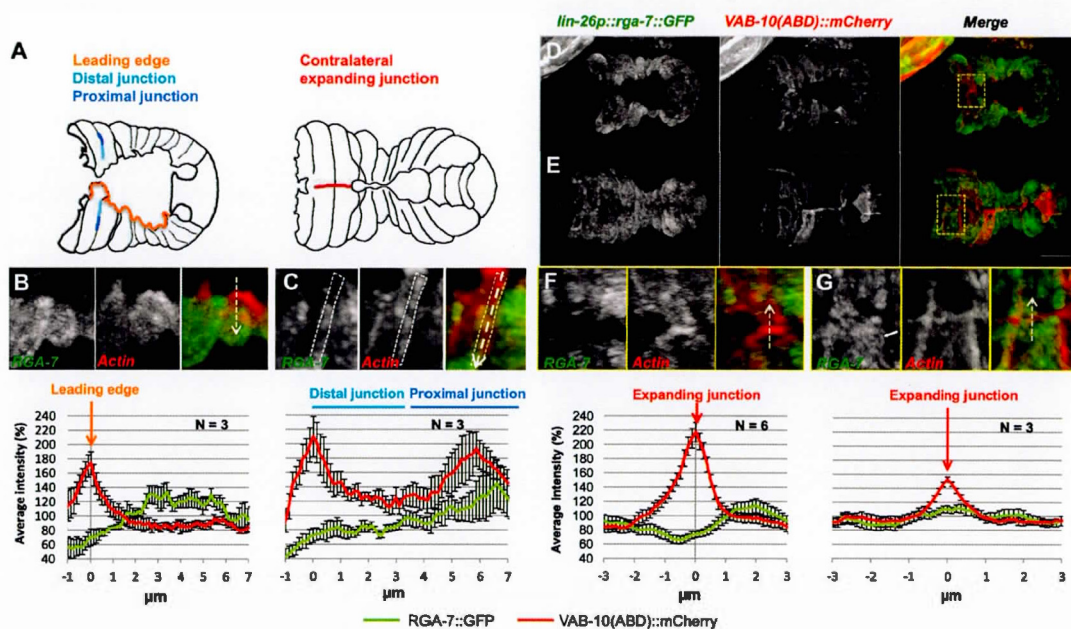


Figure 15. RGA-7::GFP is located at intracellular compartments and recruited to cell-cell junctions. (A) Schematic representation of embryos during ventral enclosure. The leading edge, distal and proximal junctions between adjacent cells (left panel) as well as expanding junctions between contralateral cells (right panel) are indicated by orange, blue and red lines respectively. (B-G) Z-projection confocal images for *sajIs20[lin-26p::rga-7::GFP]; mcIs40[lin-26p::VAB-*

10(ABD)::mCherry + myo-2p::GFP] embryos during ventral enclosure. RGA-7::GFP (left panel and green in merge) and F-actin-binding probe (middle panel and red in merge) are shown at leading edge of pocket cells (B); Distal and proximal junctions between adjacent leading cells (C); Embryo and expanding junctions between colliding contralateral leading cells (D and E), Fully enclosed embryo and fully expanded junctions between contralateral cells (F and G). Plain arrow in G represent RGA-7::GFP at intracellular tubular structures. Scale bar (D and E) = 10 μ m and (B, C, F and G) = 2 μ m. Dashed arrows indicate the line-scans used to generate the intensity plots associated to each panel (B, C, F and G)) N = number of embryos submitted to this analysis; 3 to 10 measurements were done per embryo.

RGA-7 promotes the accumulation of active CDC-42 to proximal junctions between adjacent leading cells

In light of the subcellular localisation of RGA-7::GFP at proximal junctions and the known function of WSP-1 in actin-cytoskeleton remodelling, we measured the accumulation of F-actin along the junctions between adjacent leading cells. We found that *rga-7*, *wsp-1* and *toca-1/2* control the accumulation of F-actin at the distal junctions (see supplementary data; Fig. S4). These data also revealed that the parallel pathway driving the formation of actin-rich protrusions in LCs in *rga-7(ok1498);wsp-1* and *rga-7(ok1498);toca-1/2(RNAi)* double mutants does not drive F-actin accumulation at distal junctions as efficiently as *rga-7/wsp-1/toca-1/2* pathway(s) (see supplementary data; Fig. S4).

We then determined whether RGA-7 controls the activation levels of CDC-42 at proximal and distal junctions. To do this, we first assessed the distribution of hypodermally-expressed CFP::CDC-42 at junctions between adjacent LCs (Fig. 16 A and B; arrow head indicates distance = 0 μm). We observed that CFP::CDC-42 accumulates at proximal junctions rather than distal junctions (Fig. 16 B and C). We then expressed a probe in hypodermal cells that contains the Cdc42/Rac interactive binding (CRIB) domain of WSP-1 fused with mCherry, which was previously shown to specifically detect the active form of CDC-42 (Kumfer et al., 2010). We expressed this probe together with VAB-10(ABD)::GFP in *wt* and *rga-7(ok1498)* animals. WSP-1(CRIB)::mCherry accumulated at junctions between adjacent LCs and PCs (Fig. 16 D). Interestingly, this probe was enriched at the proximal junctions between adjacent LCs (arrow; Fig. 16 D and E) and was significantly reduced in *rga-7(ok1498)* embryos (one-way ANOVA; genotype effect, distance between 4 and 6 μm ; *P-value* = 10^{-14} ; Fig. 16 D and E). These data suggest that RGA-7 is required for the accumulation of active CDC-42 at proximal junctions between adjacent leading cells.

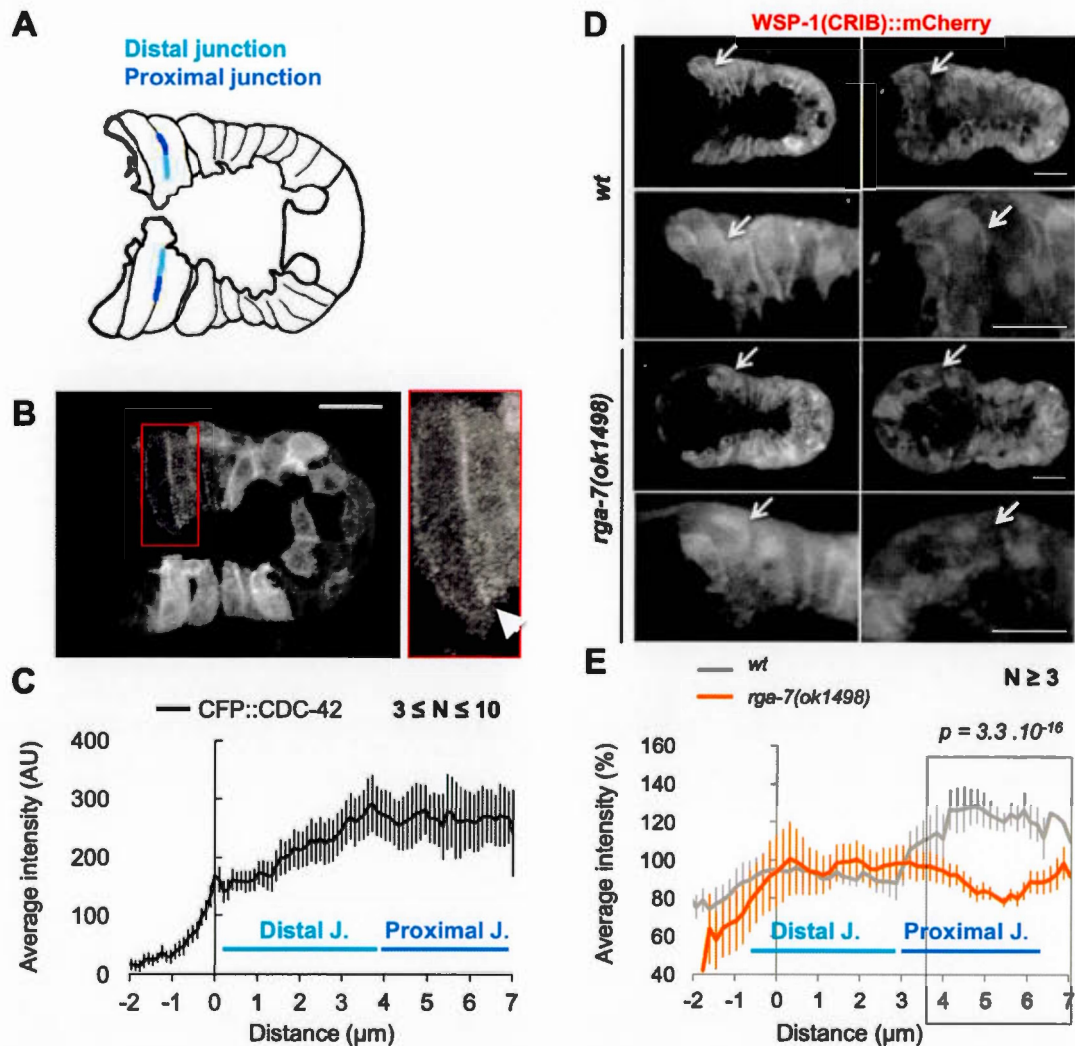


Figure 16. *rga-7* controls the accumulation of activated CDC-42 at the proximal junctions between adjacent leading cells. (A) Schematic representation of embryos indicating the location of the distal and proximal junctions between adjacent leading cells. (B) Transgenic embryo expressing CFP::CDC-42 in the hypodermis. Arrow-head indicates the reference point of intensity plots (distance = 0 μm in (C)). (C) Intensity plot showing the accumulation of CFP::CDC-42 along the distal and proximal junctions between adjacent leading cells. (D) Spatial distribution of activated CDC-42 binding probe (*WSP-1(CRIB)::mCherry*

respectively) in *wt* and *rga-7(ok1498)* embryos during ventral enclosure (left panel) and in fully enclosed embryo (right panel). Scale bars = 10 μ m. Arrows indicate junctions with high accumulation of the probe in *wt*. (E) Quantification of *WSP-1(CRIB)::mCherry* accumulation along the junctions between adjacent leading cells in *wt* and *rga-7(ok1498)* animals (distance = 0 is located at the edge of the distal junction). Arrows indicate the site of maximal probe accumulation at proximal junction. Student T-test *P-values* are indicated. N = number of embryos quantified.

The accumulation of CDC-42 at subdomains of the plasma membrane, is regulated by CDC-42-specific GAPs and GEFs (H.-O. Park and Bi, 2007; Harris and Tepass, 2010). Although counter-intuitive, since loss-of-function of a CDC-42-specific GAP would be expected to lead to an accumulation of active CDC-42, our data, using both CFP::CDC-42 and *WSP-1(CRIB)::mCherry* expressing animals, are consistent with a role for RGA-7 in regulating the localization of CDC-42 at cell-cell junctions. Unfortunately, we were unable to create transgenic lines expressing CFP::CDC-42 in *rga-7(ok1498)* likely as a result of synthetic lethality. These data suggest that RGA-7 controls the accumulation of active CDC-42 at proximal junctions, presumably by regulating the targeting of CDC-42 at this specific location.

RGA-7, WSP-1 and TOCA-1/2 control junction expansion between contralateral cells

In the initial phase of epithelial cell-cell junction formation, Rac1 and Cdc42 are activated and control the expansion of the junctional surface through N-WASP/WAVE2/Arp2/3-mediated actin polymerization (Citi et al., 2014). They also promote directed targeting of membrane vesicles to cell junctions, and the accumulation of junctional proteins (Citi et al., 2014). Considering, the genetic interaction of *rga-7* and *wsp-1* during ventral enclosure (Fig. 16 and 3), and the recruitment of RGA-7::GFP to expanding junctions between contralateral cells upon enclosure (Fig. 14 A, F and G), we determined the function of *rga-7*, *wsp-1* and *toca-1/2* during the expansion of these junctions.

We monitored the accumulation of filamentous actin (F-actin) at expanding junctions between contralateral leading cells (red line, Fig. 15 A) in embryos expressing the actin-binding probe VAB-10(ABD)::mCherry together with the junctional marker AJM-1::GFP (Fig. 17 A). F-actin began accumulating at the site of collision between contralateral leading cells before AJM-1::GFP (time = 0 min; Fig. 17 A). AJM-1::GFP started to accumulate at the expanding junctions between 6 and 8 minutes post-collision (Fig. 17 A). By following F-actin, we measured changes in the length of the expanding junctions over time in *wt* and mutant embryos expressing the actin-binding probe VAB-10(ABD)::GFP (arrows; Fig. 17A). The arrows in Figure 14 A indicate the extremities of the line-scans used to perform these measurements. We also used these

values to calculate the expansion rate of mutants versus *wt* embryos (Fig. 17 C; empty cells indicate an expansion rate not significantly different than 1; two-way ANOVA without interaction; genotype effect *P-value* > 0.05). This analysis revealed that in *wsp-1(gm324)* embryos, junction expansion was significantly reduced between 2 and 6 min after collision compared to *wt* embryos (Fig. 17 B and C; one-way ANOVA; *P-value* = 0.006) and accelerated between 8 and 16 min (Fig. 17 B and C; one-way ANOVA; *P-value* = 0.0004). From 8 min after collision, junctions expanded 1.5 to 1.7-fold faster in *rga-7(ok1498)* mutants and 1.3 to 1.6-fold faster in *toca-1/2(RNAi)* than in *wt* embryos (one-way ANOVA; *P-value* = $1.92 \cdot 10^{-8}$ and $5.7 \cdot 10^{-8}$ respectively; Fig. 17 A-C). *rga-7(ok1498);wsp-1(gm423)* and *rga-7(ok1498);toca-1/2(RNAi)* embryos displayed expansion rates similar to *wt* embryos (Fig. 17 B and C).

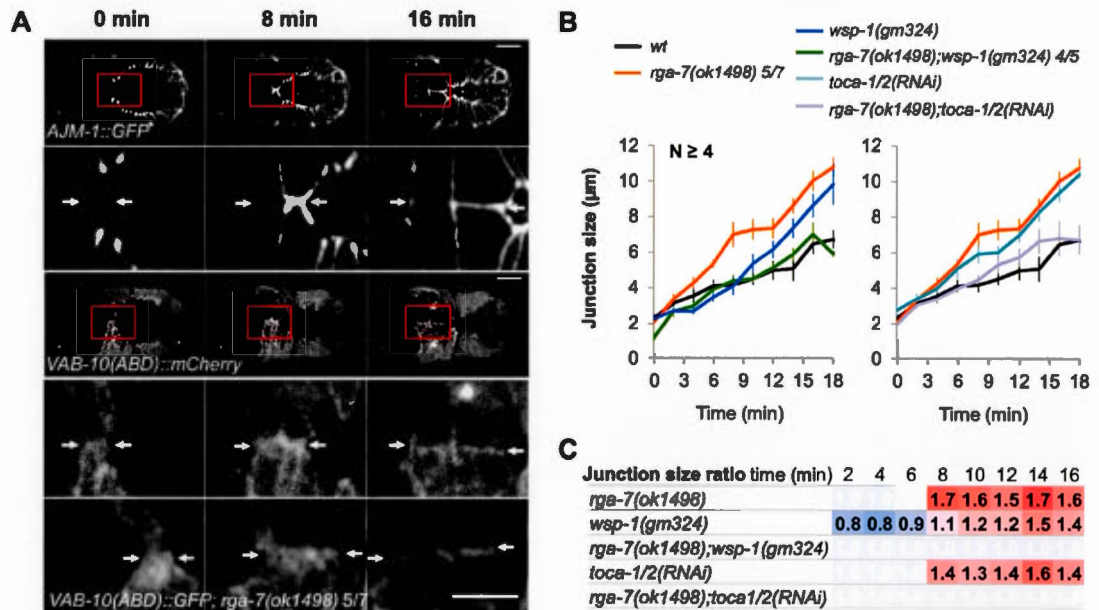


Figure 17. *rga-7*, *wsp-1* and *toca-1/2* regulate the expansion of the junctions between contralateral leading cells. (A) Time-lapse confocal images showing the junction expansion from collision between contralateral leading cells (0 min), in *wt* animals expressing *AJM-1::GFP*; *VAB-10(ABD)::mCherry* as well as *wt* and *rga-7(ok1498)* animals expressing *VAB-10(ABD)::GFP* probes. Arrows indicate the edge of expanding junctions. (B) Average size of junctions between contralateral leading cells for *wt* and mutant animals expressing *VAB-10(ABD)::GFP* probe at indicated time after collision (time = 0 min). Error bars indicate SEM. (C) This table contains ratio of junction size for mutants vs *wt* for each time-point (see methods). Ratio higher than 1 (red cells) or lower than 1 (blue cells) indicate that cell-cell junctions expand significantly faster or slower in mutant than *wt*. White cells indicate that the size of the junctions of mutant and *wt* are not significantly different.

These data suggest that *wsp-1* promotes junction expansion at an early stage of junction formation (up to 8 min after cell collision) as shown in mammals (Citi et al., 2014), and subsequently displays an anti-expansion function together with *rga-7* and *toca-1/2*. In addition, *rga-7* antagonizes *wsp-1* and *toca-1* anti-expansion functions.

We also measured F-actin accumulation during junction expansion between contralateral LCs in *wt* and mutant animals (see supplementary data; Fig. S5 A). This analysis revealed that (i) *rga-7*, *wsp-1* and *toca-1/2* control the accumulation of F-actin at these junctions in a synergistic manner; and (ii) that F-actin accumulation is regulated differently by *rga-7*, *wsp-1* and *toca-1/2* at distal junctions between adjacent LCs and at expanding junctions between contralateral cells.

RGA-7 controls the accumulation and distribution of active CDC-42 at cell junctions

Given that that RGA-7 promotes the accumulation of active CDC-42 at proximal junctions between adjacent leading cells (Fig. 16 D), we measured this accumulation at expanding junctions between contralateral leading cells (red line; Fig. 15 A) in *wt* and *rga-7(ok1498)* embryos. To do so, we measured the accumulation of the WSP-1(CRIB)::mCherry probe across the expanding junctions identified with the VAB-10(ABD)::GFP marker (dashed yellow line; Fig. 18 A). This analysis revealed that WSP-1(CRIB)::mCherry

accumulated significantly less at expanding junctions in *rga-7(ok1498)* embryos than in *wt* (Fig. 18 B; t-test *P-value* = 0.005). This suggests that RGA-7 promotes the accumulation of active CDC-42 at expanding junctions between contralateral leading cells.

We then assessed the distribution of RGA-7::GFP fusion protein at a late stage of junction expansion (> 8 min after collision). This analysis revealed that RGA-7::GFP was centrally positioned within the expanding junctions (Fig. 18 C) – RGA-7::GFP was excluded from the domains of the junctions located on average $1.94 \mu\text{m} \pm 0.323 \text{ SEM}$ from the anterior and the posterior extremities of the expanding junctions (measured on 6.26 to $9.8 \mu\text{m}$ -wide expanding junctions; N = 6 embryos; Fig. 18 C).

Our study revealed that F-actin, RGA-7::GFP and active CDC-42 form clusters of variable intensities along cell-cell junctions (Fig. 15 C and G; Fig. 18 A and C). We then investigated the distribution of these clusters at cell-cell junctions in *wt* and *rga-7* mutant animals (see Methods). Measurement of the average distance between RGA-7::GFP and F-actin clusters (A-G; Fig. 18 E) revealed that this distance was significantly lower than the distance observed between F-actin clusters (A-A; Fig. 18 E; t-test *P-value* < 0.00018) and between RGA-7::GFP clusters (G-G; Fig. 18 E; t-test *P-value* < $6.9 \cdot 10^{-5}$) at expanding, distal and proximal junctions (Fig. 18 D and E). This suggests that RGA-7::GFP accumulates close to F-actin clusters at cell-cell junctions.

Similarly, analysis of the distribution of WSP-1(CRIB)::mCherry clusters revealed that they were also distributed in close proximity to F-actin clusters in *wt* animals (A-C; Fig. 18 F; t-test between A-C and C-C *P-value* < 0.003). Moreover, the average distance between WSP-1(CRIB)::mCherry and F-actin clusters did not significantly vary between *wt* and *rga-7(ok1498)* mutant animals (Fig. 18 G; t-test *P-value* > 0.05). This suggests that active CDC-42 accumulates close to F-actin clusters and that *rga-7* function is not required to ensure this relative positioning.

Interestingly, while the average density of WSP-1(CRIB)::mCherry (defined as the number of clusters per micrometer of junction; clusters/ μ m; Fig. 18 H) was similar at all junctions in *wt* animals, this density was significantly higher at distal junctions in *rga-7(ok1498)* animals (Fig. 18 H; t-test *P-value* = 0.012). This suggests that RGA-7 inhibits the formation/maintenance of active CDC-42 clusters at distal junctions between adjacent LCs. In addition, the average distance between WSP-1(CRIB)::mCherry clusters was significantly higher at the expanding junctions in *rga-7(ok1498)* mutants compared to *wt* (C-C; t-test *P-value* = 0.004; Fig. 18 H). This suggests that *rga-7* is required to maintain the relative distribution of active CDC-42 clusters at the expanding junctions.

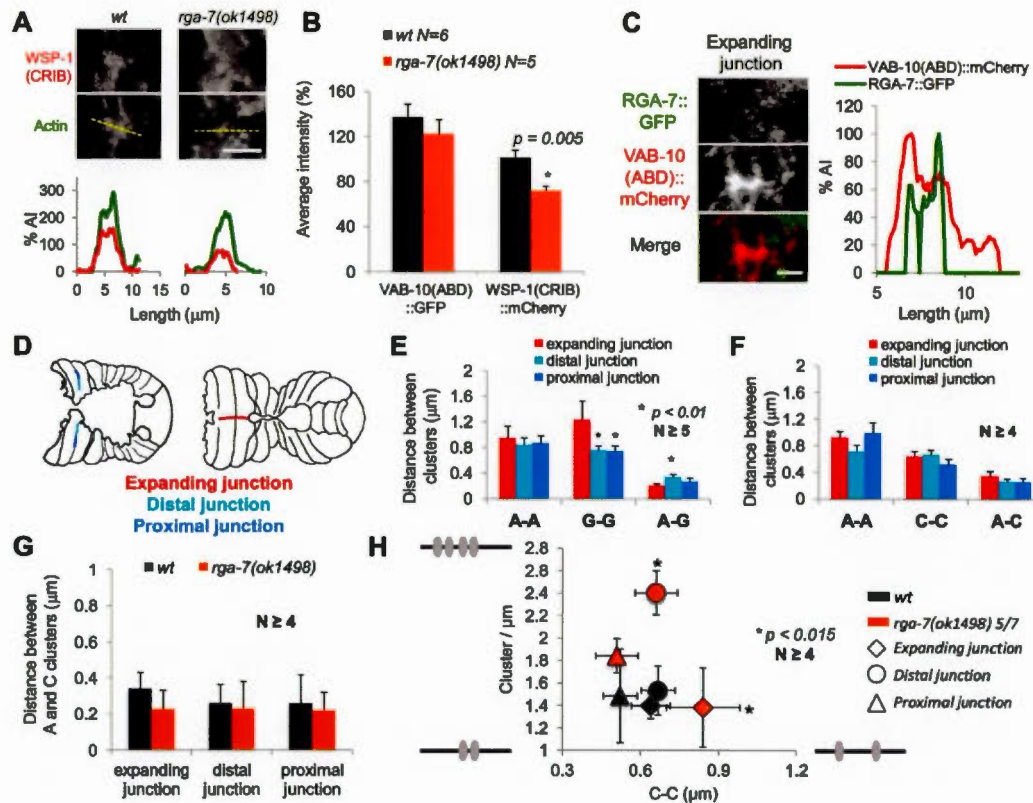


Figure 18. *RGA-7* regulates the distribution of activated CDC-42 clusters at cell-cell junctions. (A) Localization of *WSP-1(CRIB)::mCherry* and *VAB-10(ABD)::GFP* (Actin) probes in *wt* and *rga-7(ok1498)*. Dashed yellow lines indicate the line-scan used to generate the intensity plots (bottom panel). Scale bars = 5 μm. (B) Average intensity of *WSP-1(CRIB)::mCherry* and *VAB-10(ABD)::GFP* probes at expanding junctions are indicated. Student T-test *P-values* are indicated. N = number of embryos analyzed. (C) Distribution of *RGA-7::GFP* (upper panel and green in merge) and actin (with probe *VAB-10(ABD)::mCherry*; middle panel and red in merge) at expanding junctions. Graph on the right panel shows the distribution of the probes along the expanding junctions. Scale Bar = 2 μm. (D) Schematic representation of embryos during early and late phases of ventral enclosure. The distal and proximal

junctions between adjacent leading cells (light and dark blue; left panel) as well as expanding junctions between contralateral leading cells (red line; right panel) are indicated. (E-F) Distance between actin clusters (A-A), RGA-7::GFP clusters (G-G), activated-CDC42 clusters (C-C), and between filamentous actin (F-actin) and RGA-7 (A-G) or F-actin and activated CDC-42 (A-C), at expanding, distal and proximal junctions. (G) Distance between F-actin clusters and activated-CDC42 clusters at expanding, distal and proximal junctions in *wt* and *rga-7(ok1498)* animals. (H) Scatter plot representing the density (number of clusters per μm) and the distance between clusters of activated-CDC-42 (C-C) in *wt* and *rga-7(ok1498)* embryos for expanding, distal and proximal junctions. T-test *P-values* are indicated. N = number of embryos quantified. Error bars represent SEM.

All together these data suggest that both RGA-7 and active CDC-42 are targeted to the vicinity of F-actin clusters at proximal, distal and expanding junctions. The distribution of these proteins relative to F-actin clusters may not specifically involve RGA-7 function. However, RGA-7 may negatively regulate the spreading of active CDC-42 clusters through inhibiting the generation/maintenance of these clusters at distal junctions between adjacent leading cells and maintaining the relative distance between clusters at new junctions expanding between contralateral cells. We hypothesize that RGA-7 functions both in restricting active CDC-42 to specific domains within the junctions between leading cells undergoing collective migration, as well as in newly formed and expanding junctions.

Discussion

Here, we show that *rga-7* gene codes for a RhoGAP with a GAP activity that is specific to CDC-42 and RHO-1/RhoA. We also propose that RGA-7 controls the spatial distribution of active CDC-42 at the junctions between leading cells during their collective migration towards the ventral midline and at the junctions forming and expanding between contralateral leading cells.

In this function, the RGA-7 gene is required in hypodermal cells, in parallel with RHO-1's effector LET-502/ROCK. More specifically, RGA-7 controls the formation of actin-rich protrusions at the front of migrating leading cells in a manner that is antagonistic with CDC-42's effector WSP-1/N-WASP and the CDC-42-interacting proteins TOCA-1/2/Toca1/FBP17. It also functions in parallel with a pathway that is only functional in the absence of the combination of RGA-7 and WSP-1 or RGA-7 and TOCA-1/2 (Fig. 19 A). RGA-7, WSP-1 and TOCA-1/2 modulate the accumulation of F-actin at the junctions between adjacent leading cells during their migration; an accumulation inefficiently promoted by the parallel pathway identified above (Fig. 8 A). Importantly, our study revealed that RGA-7 is recruited to proximal junctions between adjacent leading cells where it promotes the accumulation of active CDC-42. It also inhibits the accumulation of activated CDC-42 at distal junctions located closer to the leading edge of migrating cells (Fig. 8 A).

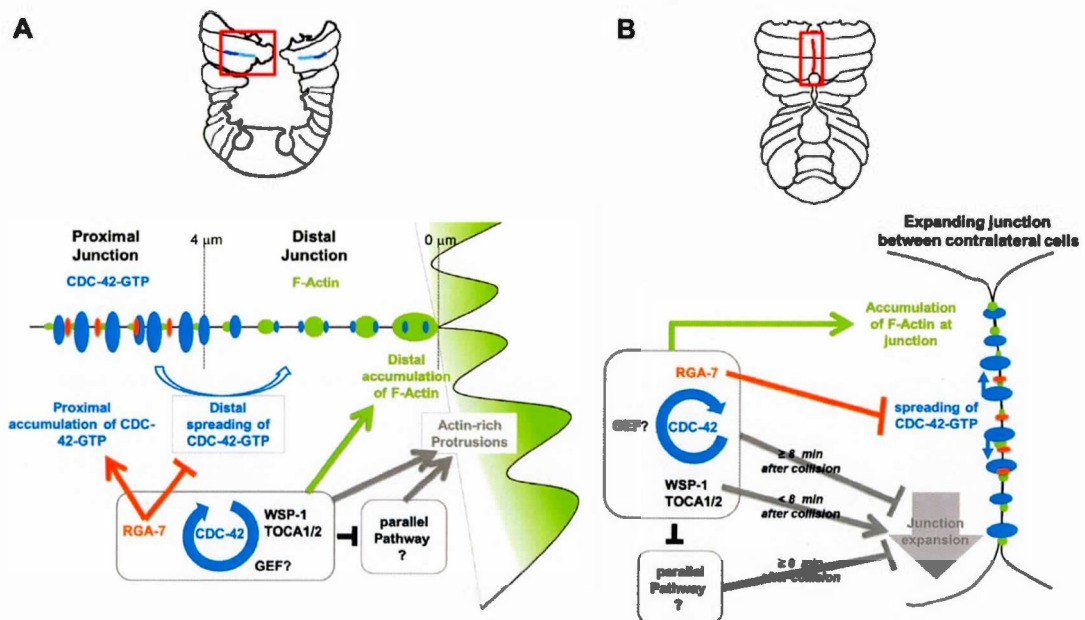


Figure 19. RGA-7 spatially controls active CDC-42 at cell-cell junctions during collective migration and expansion of newly formed junctions. (A) During early phase of ventral enclosure, RGA-7 is recruited to the proximal junctions between adjacent leading cells. It promotes the accumulation of active CDC-42 clusters at proximal junctions and inhibits their spreading towards the distal junctions. RGA-7 controls the formation of actin-rich protrusions at the leading edge of leading cells in an antagonistic manner with WSP-1 and TOCA-1/2 and in parallel of a pathway that remains to be identified. The function of RGA-7, WSP-1 and TOCA-1/2 is essential for the accumulation of F-actin at the distal junctions between adjacent leading cells. (B) Once leading cells meet at the ventral midline, the junctions between contralateral cells accumulate F-actin and expansion is promoted by WSP-1. Eight minutes after collision, Junctional proteins start to accumulate at expanding junctions and RGA-7, WSP-1 and TOCA-1/2 tend to reduce the expansion rate of these junctions. At that specific stage, RGA-7 promotes the

accumulation of activated CDC-42 at expanding junctions and inhibits the dispersion of the clusters they form.

The characterization of the functional roles of RGA-7, WSP-1 and TOCA-1/2 during the formation of new junctions between contralateral leading cells revealed that: (i) WSP-1 promotes the expansion of these junctions at an early stage of the junction formation independently of TOCA-1/2 and of RGA-7 (< 8 minutes after collision; Fig. 8 B); (ii) when junctional proteins start to accumulate at the junctions (≥ 8 min after collision; Fig. 8 B), the functions of RGA-7, WSP-1 and TOCA-1/2 tend to reduce the rate of expansion of the junctions in an antagonistic manner and in parallel with a pathway that remains to be identified. At this specific stage, RGA-7 promotes the accumulation of active CDC-42 clusters at the junctions and negatively regulates their spreading during the expansion process.

RGA-7 regulates the GTPase activity of CDC-42 in hypodermal cells during ventral enclosure

RGA-7 was recently shown to regulate embryo expulsion from spermatheca through the regulation of RHO-1/RhoA activity (Pei Y. Tan and Zaidel-Bar, 2015b). This function is supported by the alleviating/epistatic interaction observed between *rga-7(ok1498)* and *let-502* hypomorphic allele in this system (Pei Y. Tan and Zaidel-Bar, 2015b). We showed that *rga-7* controls ventral enclosure synergistically with *let-502* and antagonistically with *wsp-*

1 and *toca-1/2* suggesting that RGA-7 regulates the GTPase activity of CDC-42 in the hypodermis during ventral enclosure. This hypothesis is also supported by the observation that overexpression of CDC-42 but not RHO-1 displays similar migratory defects of leading cells than *rga-7* loss-of-function.

Most RhoGAPs present GAP specificity towards several GTPases (S. a. L.-V. Jenna, N. , 2003). They usually display a more stringent specificity *in vivo* than *in vitro* (S. a. L.-V. Jenna, N. , 2003) demonstrating a clear preference for a particular GTPase. However, few RhoGAPs display a specific GAP activity towards several GTPases *in vivo*. For instance, Rga4 controls cell polarity and morphogenesis of *Schizosaccharomyces pombe* through regulation of Cdc42 GTPase activity and cell integrity and cell separation through regulation of Rho2 (Cansado et al., 2010). Recent data, including our own, suggests that RGA-7 regulates the GTPase activity of RHO-1 in spermatheca during embryos expulsion to the uterus (Pei Y. Tan and Zaidel-Bar, 2015b) and CDC-42 during ventral enclosure. Interestingly, RGA-7 exhibits almost 10-times more GAP activity towards CDC-42 than RHO-1 *in vitro*, and is more expressed in the spermatheca of adults than in the hypodermis of embryos during ventral enclosure (Fig. S2 D). This suggests that RGA-7 GAP specificity may be, at least partially, regulated by its expression level. While genetic interaction with *let-502* in the two systems suggests that *rga-7* may exhibit GAP specificity predominantly towards either RHO-1 or CDC-42, the possibility that RGA-7 may regulate the GTPase activity of both CDC-42 and RHO-1

in both systems in a spatially restricted manner cannot be excluded.

RGA-7 regulates CDC-42 accumulation and distribution at cell-cell junctions

As detailed in the introduction, restriction of the Cdc42 activation zone depends on exocytosis, endocytosis, feed-forward loops promoting Cdc42 accumulation and activation as well as recruitment of RhoGAPs to limit the spatial expansion of activated Cdc42 clusters in yeast (H.-O. Park and Bi, 2007; Harris and Tepass, 2010). Interestingly, Cdc42 together with the F-BAR protein TOCA1/TOCA-1 and N-WASP/WSP-1 were shown to control actin-dependent endocytosis of junctional proteins in several systems including *C. elegans* (Chiara Giuliani et al., 2009a). N-WASP was also shown to participate in feed-forward mechanisms promoting Cdc42 activation during endocytosis (Hussain et al., 2001; Humphries et al., 2014).

The efficient cycling of Cdc42 between its active (GTP-bound) and inactive (GDP-bound) forms is essential for Cdc42 biological function across multiple systems (Fidyk et al., 2006). This is supported by experiments with mutants that either block Cdc42 activation (Guanine-nucleotide exchange activity) or inactivate it (GTP-hydrolysis activity) and that still display similar phenotype(s) (Fidyk et al., 2006). An appealing hypothesis that explains RGA-7 antagonism with both WSP-1 and TOCA-1/2 during ventral enclosure is that the CDC-42-specific GAP activity of RGA-7 may

antagonize WSP-1 and TOCA-1/2 function during endocytosis at cell junctions as well as WSP-1 potential feedforward function on CDC-42 activation through GEFs. This later hypothesis is strongly supported by the observation that *rga-7;wsp-1* embryos complete ventral enclosure significantly more efficiently than single mutants but not quite as efficiently as *wt* embryos. Inhibition of CDC-42-dependent endocytosis at proximal and expanding cell junctions by RGA-7, may lead to the accumulation of CDC-42 at the junctions and explain the observed reduction of the accumulation of active CDC-42 at these junctions in *rga-7* mutants.

Studies using drugs disrupting actin structures in budding yeast revealed that once Cdc42 clustering at the bud site is established, exocytic delivery of Cdc42 is required to counteract the dispersal of Cdc42 clusters at the plasma membrane mediated by actin-dependent endocytosis (H.-O. Park and Bi, 2007). Inhibition of endocytosis by RGA-7 may then reduce the dispersal of active CDC-42 clusters within junctions. This hypothesis also accounts for the increased spreading of these clusters from proximal to distal junctions between adjacent leading cells and within expanding junctions between contralateral cells in *rga-7(ok1498)* mutants.

Given the RGA-7::GFP accumulation at punctate and tubular endomembranes and its recruitment to proximal junctions, we cannot exclude that RGA-7 may regulate exocytic and/or endocytic recycling processes. Negative regulation of both CDC-42-dependent exocytosis and endocytosis by RGA-7 is also an attractive hypothesis that may explain the accumulation of activated CDC-42 clusters at distal junctions observed in *rga-7(ok1498)* embryos.

Dissection of mechanisms that regulate CDC-42-dependent endocytosis and exocytosis/endocytic recycling at the junctions between hypodermal cells during ventral enclosure will be required to confirm these hypotheses.

Regulation of restricted CDC-42 activation zone during collective migration

During cell migration, coordination of Rho GTPases involves spatial segregation of active RhoA and Cdc42 as shown in migrating fibroblasts (Machacek et al., 2009) and during wound healing in *Xenopus* oocytes (Benink and Bement, 2005). This distribution of active RhoA at the distal/front of leading cells of collectively migrating cell groups and of Cdc42 at a proximal/back location compared to RhoA may be evolutionary conserved (Benink and Bement, 2005; Reffay et al., 2014). In this context, RGA-7's function in spatially controlling active CDC-42 accumulation at proximal junctions may contribute to the spatial segregation of active RHO-1/RhoA and CDC-42/Cdc42 at cell junctions between leading cells and to their ability to drive collective migration towards the ventral midline.

In conclusion, we showed that the CDC-42 and RHO-1-specific GAP, RGA-7 controls the accumulation and distribution of the active CDC-42 at restricted sites of the junctions between leading cells migrating collectively and during the expansion of new junctions forming between contralateral cells. We showed that RGA-7

functions antagonistically with WSP-1/N-WASP and TOCA-1/2, two proteins controlling actin- and CDC-42-dependent endocytosis. Our data suggest that spatial restriction of CDC-42's active zone by RGA-7 is critical for collective migration of hypodermal cells and important in regulating the dynamics of cell-cell junction formation and expansion.

METHODS

Strains and Culture Methods

Nematodes were maintained in standard conditions at 20°C (Brenner, 1974). Worm strains carrying the following mutations and markers: *rga-7(ok1498)* II, *wsp-1(gm324)* IV, *mcIs40* [*lin-26p::VAB-10(ABD)::mCherry* + *myo-2p::GFP*] , *mcIs50* [*lin-26p::VAB-10(ABD)::GFP* + *myo-2p::GFP*] and *jcIs1{ajm-1::GFP, pRF4[rol-6(su1006)]}* were obtained from the *Caenorhabditis* Genetic Center (CGC). Strain carrying *let-502(sb118ts)* I was kindly provided by Dr Paul Mains (University of Calgary, Calgary, Canada). Mutant strains were backcrossed at least 4 times against wild-type (wt) animals prior to analysis.

Generation of Transgenic animals

All transgenic animals were generated through biolistic bombardment of *unc-119(ed3)* animals, using a PDS-1000/He system with the Hepta adaptor (Bio-Rad) as previously reported (Berezikov et al., 2004). At least three independent lines were isolated and characterized per construct. *sajIs22[rga-7p::rga-7::GFP; unc-119^R]* was generated through recombination of pDONRP4P1R-*rga-7p* containing 5kb of the genomic sequence upstream of RGA-7 initiation codon with, pDONR201-*rga-7* and pMB14. pDONR201-*rga-7* contains genomic sequence from RGA-7 initiation codon in exon 1 up to exon 8 fused to cDNA sequence up to the stop codon of the gene located at exon 20. Similarly, *sajIs20[lin-26p::rga-7::GFP; unc-119^R]*, was generated through the

recombination of pDONRP4P1R-*lin-26p* containing 5kb of the *lin-26* promoter (Martin et al., 2014b), pDONR201-*rga-7* and pMB14. *sajIs29[lin-26p::CFP::rho-1::3'UTR; unc-119^R]* and *sajIs30[lin-26p::CFP::cdc42::3'UTR; unc-119^R]* were obtained through recombination of pDONRP4P1R-*lin-26p*, pDONR201-CFP-*rho-1* or pDONR201-CFP-*cdc-42*, pCM5.37 containing the *unc54* 3'UTR (Addgene) and pCG150 destination vector (Addgene). *wsp-1* CRIB domain (cDNA coding for 78 amino-acids from position 230 to 308 of WSP-1) was cloned in pDONR201 and recombined together with pDONRP4P1R-*lin-26p* in pULSRG1 (containing attB4-ccdB-attB2 followed by mCherry-pie-1 3'UTR; kindly provided by Dr Ian Hope, Univ. Leeds, UK). The resulting vector was used to generate *sajIs31[lin-26p::wsp-1(CRIB)::mCherry; unc-119^R]* transgenic animals. See Supplementary Methods for details.

Isolation of strains carrying several mutant alleles and transgenes

rga-7(ok1498) II; wsp-1(gm324) IV was generated by crossing *wsp-1(gm324) IV* hermaphrodites with *rga-7(ok1498) II* males. Mutant animals expressing *lin-26p::VAB-10(ABD)::GFP* were obtained by crossing mutant hermaphrodites with *mcIs50 [lin-26p::VAB-10(ABD)::GFP + myo-2p::GFP]* males. Double mutant homozygotes and animals carrying two copies of transgenes were isolated from the F2 progenies as animals segregating only fluorescent progeny and/or identification of mutant alleles in genomic DNA using PCR. *let-502(sb118ts) I* was maintained at 20°C and *rga-7(ok1498) II; let-502(sb118ts) I* was generated after

crossing *let-502(sb118ts) I* hermaphrodites with *rga-7(ok1498) II* males. *let-502(sb118ts) I* homozygotes were identified through scoring of embryonic lethality (Emb) and larval arrest (Lva) phenotypes at 18°C and 25.5°C and identification of thermosensitive behavior of isolated populations. pL4440 constructs containing *toca-1* and *toca-2* sequences were retrieved from the genome-wide RNA interference (RNAi) library (Kamath et al., 2003) and confirmed by sequencing. RNAi treatment was done using feeding protocol as detailed in Supplementary Methods.

Phenotyping mutant animals and 4-dimensional microscopy

Emb phenotype was scored after isolation of 10-12 worms on NGM agar with OP50 as a source of food. Worms were allowed to lay eggs at 20°C for 5 to 6 hours and were removed from the plate and laid embryos were counted. After 24 hours, dead embryos were counted to assess Emb. The stage of embryonic arrest was confirmed in mutant animals using time-lapse DIC microscopy as previously described (Martin et al., 2014b). Embryos dissected from adult hermaphrodites were mounted on 3% agarose pads in M9 buffer and coverslips were sealed with drawing gum (Pébéo). Elongation was recorded using 4-dimensional microscopy (3D and time), which recorded a Z-stack every 2 minutes during 10 hours at room temperature or 25.5°C using a Leica DM5500 microscope equipped with a 63X oil immersion objective upon differential interference contrast illumination (DIC). Images were captured using Leica LAS AF imaging software. These recording were used to assess morphological defects during embryonic development. Slow

ventral enclosure was identified for embryos completing their ventral enclosure in more than 1 hour from the time leading cells could be observed migrating at the embryo periphery.

***In vitro* GAP activity assay**

To assess the specificity of RGA-7 GAP activity, we expressed a His6-tagged RGA-7 GAP domain as a recombinant protein in bacteria using pTRchis gateway converted vector as previously done (S. Jenna et al., 2005). We purified the recombinant protein and measured its ability to catalyze the hydrolysis of GTP by the six recombinant Rho GTPases identified in the *C. elegans* genome: the Racs CED-10 and RAC-2, the RhoG MIG-2, the Cdc42 CDC-42, the RhoA RHO-1 and the atypical Rho GTPase CRP-1 and expressed as recombinant Glutathione S Transferase (GST)-fusion proteins. To do so, we used a filtration assay as previously described (S. Jenna et al., 2005). We measured the amount of GTP- γ 32P remaining bound to the GTPase after 5 min incubation at 25°C in the absence (control condition) or in the presence of 10 or 100 nM of GAP and computed, the ratio of GTP-remaining bound on the GTPase over the control condition at each concentration of GAP.

Confocal fluorescence microscopy

The expression pattern of RGA-7::GFP and its subcellular localization in living animals was observed using a Nikon A1R confocal microscope using 100X oil CFI NA 1.45 Plan Apochromat λ objective. All images were captured using NIS-Elements software (Nikon) with a pinhole size of 85.6 μ m, a calibration of 0.10

$\mu\text{m}/\text{pixel}$ (radial resolution of $0.20\ \mu\text{m}$) and a Z-step of $0.200\ \mu\text{m}$. Deconvolution was done using Autoquant3X, 3D deconvolution software. Orthogonal views were generated using ImageJ software. Dynamic time-lapses were achieved by using 60X oil CFI NA 1.4 Plan ApoChromat I objective on Nikon A1R confocal microscope. Imaging of CFP::CDC-42 and CFP::RHO-1 were respectively done on *sajIs29* and *sajIs30* carrying embryos by capturing 19 to 21 Z-planes of $0.400\ \mu\text{m}$ each every 2 minutes during 40 minutes. Acquisitions for ruffles ratios were obtained on embryos of other transgenic animals described in the results section by capturing 21 Z-planes of $0.400\ \mu\text{m}$ each every 62 seconds (no delay) during 1 hour. Acquisition on *unc-119(ed3);sajIs31[lin-26p::wsp-1(CRIB)::mCherry];mcIs50[lin-26p::VAB-10(ABD)::GFP+myo-2p::GFP]* and *rga-7(ok1498);unc-119(ed3); sajIs31[lin-26p::wsp-1(CRIB)::mCherry];mcIs50[lin-26p::VAB-10(ABD)::GFP+myo-2p::GFP]* were done using a swept-field confocal microscope with a 100X oil CFI NA 1.45 Plan ApoChromat λ objective. Image and statistical analysis were done as detailed in Supplementary Methods.

Acknowledgments

Thanks to Dr Paul Mains (University of Calgary, Calgary, Canada) and (Ian Hope, Leeds University, UK) for providing material and to Dr Marc Lussier (UQAM, Montréal, Canada) and Alisa Piekny (Concordia University) for helpful discussions and comments on the manuscript. Some of the strains were provided by the

Caenorhabditis Genetics Center, which is funded by NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440).

Funding Statement

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada and The Canada Foundation for Innovation. S. J. is funded by Canada Research Chair program. M-H.O and E.M. are funded by the FARE UQAM research fellowship.

The authors declare no financial conflict of interest.

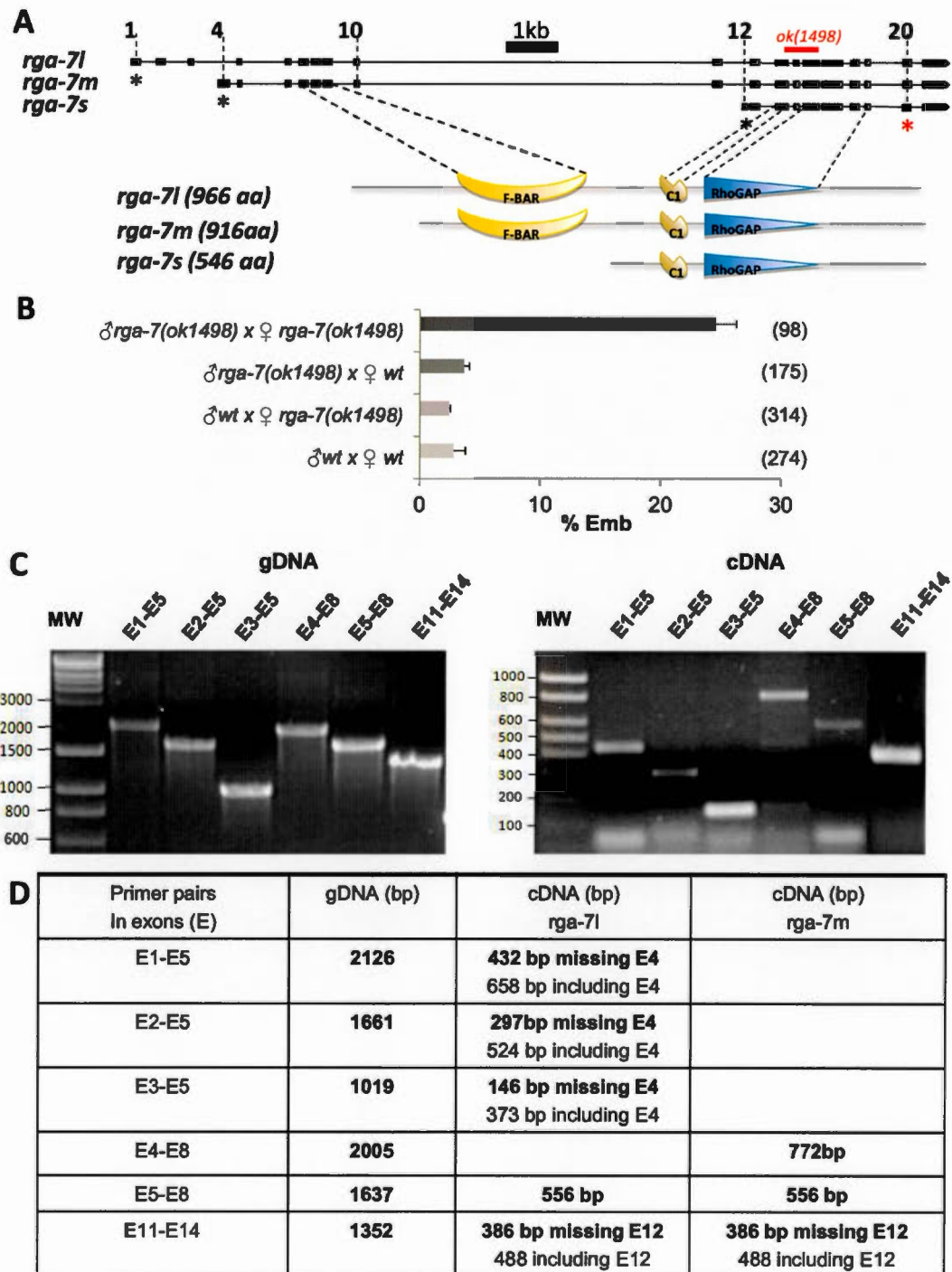
References

- Bastock, R., and Strutt, D. (2007). The planar polarity pathway promotes coordinated cell migration during *Drosophila* oogenesis. *Development (Cambridge, England)* *134*, 3055-3064.
- Benink, H.A., and Bement, W.M. (2005). Concentric zones of active RhoA and Cdc42 around single cell wounds. *The Journal of Cell Biology* *168*, 429-439.
- Berezikov, E., Bargmann, C.I., and Plasterk, R.H. (2004). Homologous gene targeting in *Caenorhabditis elegans* by biolistic transformation. *Nucleic Acids Res* *32*, e40.
- Brenner, S. (1974). THE GENETICS OF CAENORHABDITIS ELEGANS. *Genetics* *77*, 71-94.
- Bu, W., Lim, K.B., Yu, Y.H., et al. (2010). Cdc42 Interaction with N-WASP and Toca-1 Regulates Membrane Tubulation, Vesicle Formation and Vesicle Motility: Implications for Endocytosis. *PLoS ONE* *5*, e12153.
- Cansado, J., Soto, T., Gacto, M., et al. (2010). Rga4, a Rho-GAP from fission yeast: Finding specificity within promiscuity. *Communicative & Integrative Biology* *3*, 436-439.
- Chisholm, A.D., and Hardin, J. (2005). Epidermal morphogenesis. *WormBook*, 1-22.
- Citi, S., Guerrero, D., Spadaro, D., et al. (2014). Epithelial junctions and Rho family GTPases: the zonular signalosome. *Small GTPases* *5*, 1-15.
- Elbediwy, A., Zihni, C., Terry, S.J., et al. (2012). Epithelial junction formation requires confinement of Cdc42 activity by a novel SH3BP1 complex. *The Journal of Cell Biology* *198*, 677-693.
- Fidyk, N., Wang, J.B., and Cerione, R.A. (2006). Influencing cellular transformation by modulating the rates of GTP hydrolysis by Cdc42. *Biochemistry* *45*, 7750-7762.
- Fotopoulos, N., Wernike, D., Chen, Y., et al. (2013). *Caenorhabditis elegans* anillin (ani-1) regulates neuroblast cytokinesis and epidermal morphogenesis during embryonic development. *Developmental Biology* *383*, 61-74.
- Friedl, P., and Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 445-457.
- Friedl, P., Wolf, K., and Zegers, M.M. (2014). Rho-directed forces in collective migration. *Nat Cell Biol* *16*, 208-210.

- Giuliani, C., Troglio, F., Bai, Z., et al. (2009). Requirements for F-BAR Proteins TOCA-1 and TOCA-2 in Actin Dynamics and Membrane Trafficking during *Caenorhabditis elegans* Oocyte Growth and Embryonic Epidermal Morphogenesis. *PLoS Genetics* 5, e1000675.
- Harris, K.P., and Tepass, U. (2010). Cdc42 and Vesicle Trafficking in Polarized Cells. *Traffic* 11, 1272-1279.
- Hidalgo-Carcedo, C., Hooper, S., Chaudhry, S.I., et al. (2011). Collective cell migration requires suppression of actomyosin at cell-cell contacts mediated by DDR1 and the cell polarity regulators Par3 and Par6. *Nature cell biology* 13, 49-58.
- Humphries, A.C., Donnelly, S.K., and Way, M. (2014). Cdc42 and the Rho GEF intersectin-1 collaborate with Nck to promote N-WASP-dependent actin polymerisation. *J Cell Sci* 127, 673-685.
- Hussain, N.K., Jenna, S., Glogauer, M., et al. (2001). Endocytic protein intersectin-1 regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP. *Nat Cell Biol* 3, 927-932.
- Jenna, S., Caruso, M.E., Emadali, A., et al. (2005). Regulation of Membrane Trafficking by a Novel Cdc42-related Protein in *Caenorhabditis elegans* Epithelial Cells. *Molecular Biology of the Cell* 16, 1629-1639.
- Jenna, S. and Lamarche-Vane N. . (2003). The Superfamily of Rho GTPase-activating-proteins. New York: Kluwer Academic.
- Kamath, R.S., Fraser, A.G., Dong, Y., et al. (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 421, 231-237
- Khursheed, M., and Bashyam, M.D. (2014). Apico-basal polarity complex and cancer. *J Biosci* 39, 145-155.
- Kovacs, E.M., Verma, S., Thomas, S.G., et al. (2011). Tuba and N-WASP function cooperatively to position the central lumen during epithelial cyst morphogenesis. *Cell Adh Migr* 5, 344-350.
- Kumfer, K.T., Cook, S.J., Squirrell, J.M., et al. (2010). CGEF-1 and CHIN-1 Regulate CDC-42 Activity during Asymmetric Division in the *Caenorhabditis elegans* Embryo. *Molecular Biology of the Cell* 21, 266-277.
- Leibfried, A., Fricke, R., Morgan, M.J., et al. (2008). *Drosophila* Cip4 and WASp Define a Branch of the Cdc42-Par6-aPKC




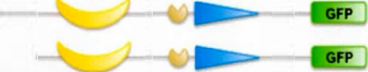
- Pathway Regulating E-Cadherin Endocytosis. *Current Biology* **18**, 1639-1648.
- Lin, L., Tran, T., Hu, S., et al. (2012). RHGF-2 is an essential Rho-1 specific RhoGEF that binds to the multi-PDZ domain scaffold protein MPZ-1 in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* **7**, e31499.
- Lundquist, E.A., Reddien, P.W., Hartwig, E., et al. (2001). Three *C. elegans* Rac proteins and several alternative Rac regulators control axon guidance, cell migration and apoptotic cell phagocytosis. *Development* **128**, 4475-4488.
- Machacek, M., Hodgson, L., Welch, C., et al. (2009). Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* **461**, 99-103.
- Martin, E., Harel, S., Nkengfac, B., et al. (2014). pix-1 Controls Early Elongation in Parallel with mel-11 and let-502 in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* **9**, e94684.
- Osmani, N., Peglion, F., Chavrier, P., et al. (2010). Cdc42 localization and cell polarity depend on membrane traffic. *J Cell Biol* **191**, 1261-1269.
- Park, H.-O., and Bi, E. (2007). Central Roles of Small GTPases in the Development of Cell Polarity in Yeast and Beyond. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71**, 48-96.
- Pertz, O. (2010). Spatio-temporal Rho GTPase signaling – where are we now? *Journal of Cell Science* **123**, 1841-1850.
- Pichot, C.S., Arvanitis, C., Hartig, S.M., et al. (2010). Cdc42-interacting protein 4 promotes breast cancer cell invasion and formation of invadopodia through activation of N-WASp. *Cancer Res* **70**, 8347-8356.
- Piekny, A.J., Wissmann, A., and Mains, P.E. (2000). Embryonic morphogenesis in *Caenorhabditis elegans* integrates the activity of LET-502 Rho-binding kinase, MEL-11 myosin phosphatase, DAF-2 insulin receptor and FEM-2 PP2c phosphatase. *Genetics* **156**, 1671-1689.
- Reffay, M., Parrini, M.C., Cochet-Escartin, O., et al. (2014). Interplay of RhoA and mechanical forces in collective cell migration driven by leader cells. *Nat Cell Biol* **16**, 217-223.
- Sawa, M., Suetsugu, S., Sugimoto, A., et al. (2003). Essential role of the *C. elegans* Arp2/3 complex in cell migration during ventral enclosure. *Journal of Cell Science* **116**, 1505-1518.

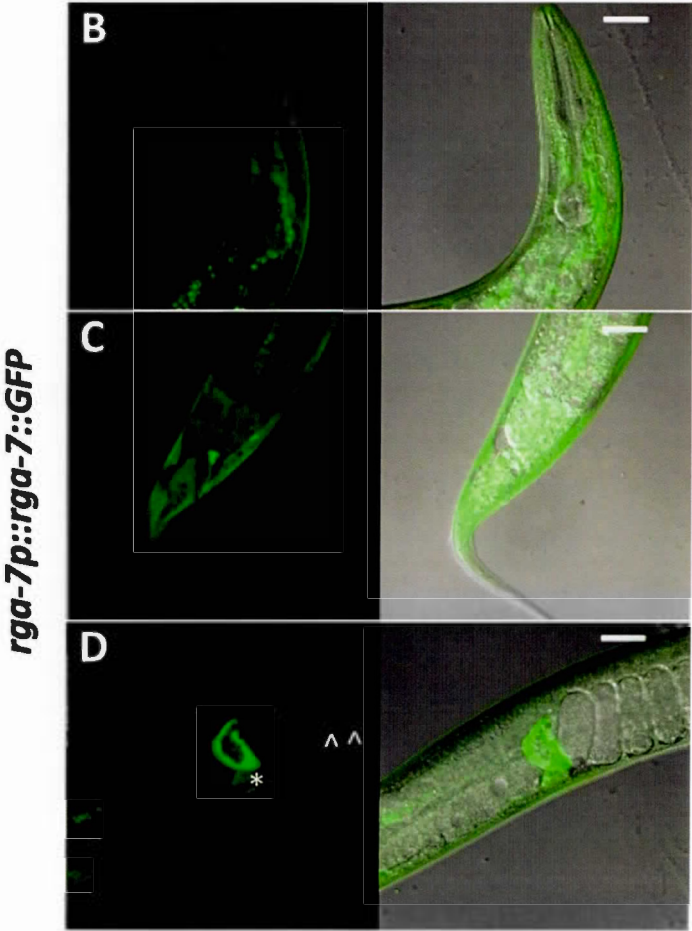
- Sawa, M., and Takenawa, T. (2006). *Caenorhabditis elegans* WASP-interacting protein homologue WIP-1 is involved in morphogenesis through maintenance of WSP-1 protein levels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340, 709-717.
- Sheffield, M., Loveless, T., Hardin, J., et al. (2007). *C. elegans* Enabled Exhibits Novel Interactions with N-WASP, Abl, and Cell-Cell Junctions. *Current Biology* 17, 1791-1796.
- Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81, 153-208.
- Tan, Pei Y., and Zaidel-Bar, R. (2015). Transient Membrane Localization of SPV-1 Drives Cyclical Actomyosin Contractions in the *C. elegans* Spermatheca. *Current Biology* 25, 141-151.
- Williams-Masson, E.M., Malik, A.N., and Hardin, J. (1997). An actin-mediated two-step mechanism is required for ventral enclosure of the *C. elegans* hypodermis. *Development* 124, 2889-2901.
- Withee, J., Galligan, B., Hawkins, N., et al. (2004). *Caenorhabditis elegans* WASP and Ena/VASP Proteins Play Compensatory Roles in Morphogenesis and Neuronal Cell Migration. *Genetics* 167, 1165-1176.
- Wu, C.-F., and Lew, D.J. (2013). Beyond Symmetry Breaking: Competition and Negative Feedback in GTPase regulation. *Trends in cell biology* 23, 476-483.



Supplemental Figure 1. Molecular structure, expression and zygotic requirement of *rga-7* for ventral enclosure. (A) *rga-7* codes for three transcripts (*rga-7l*, *rga-7m* and *rga-7s*). RGA-7 proteins display consensus F-BAR (FCS (Fes/CIP4 homology)-Bin-Amphiphysin-Rvs), C1 (Cystein-rich) and RhoGAP domains (B) Percentage of embryonic lethality (Emb) for the progeny of *wt* and *rga-7(ok1498)* hermaphrodites mated with *wt* or *rga-7(ok1498)* males. Numbers in brackets indicate the number of counted embryos. Similar results were obtained across three independent experiments. (C) Agarose electrophoresis separation of *rga-7* genomic DNA (gDNA) or complementary DNA (cDNA) amplified using specific primers for indicated exons (E1-14 as indicated in panel A). Expected molecular structure in terms of exon composition of amplicons at observed molecular weights are indicated in bold (D).

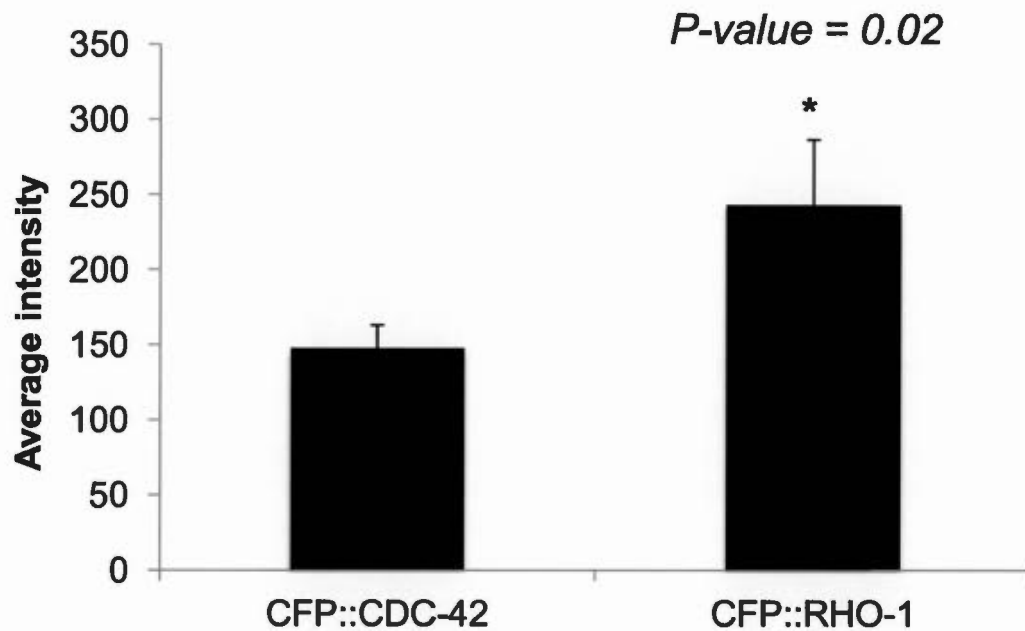
A

Construct names	DNA sequences	Protein products
<i>sajIs22</i> [<i>rga-7p::rga-7::GFP</i> ; <i>unc-119R</i>]		
<i>sajIs20</i> [<i>lin-26p::rga-7::GFP</i> ; <i>unc-119R</i>]		

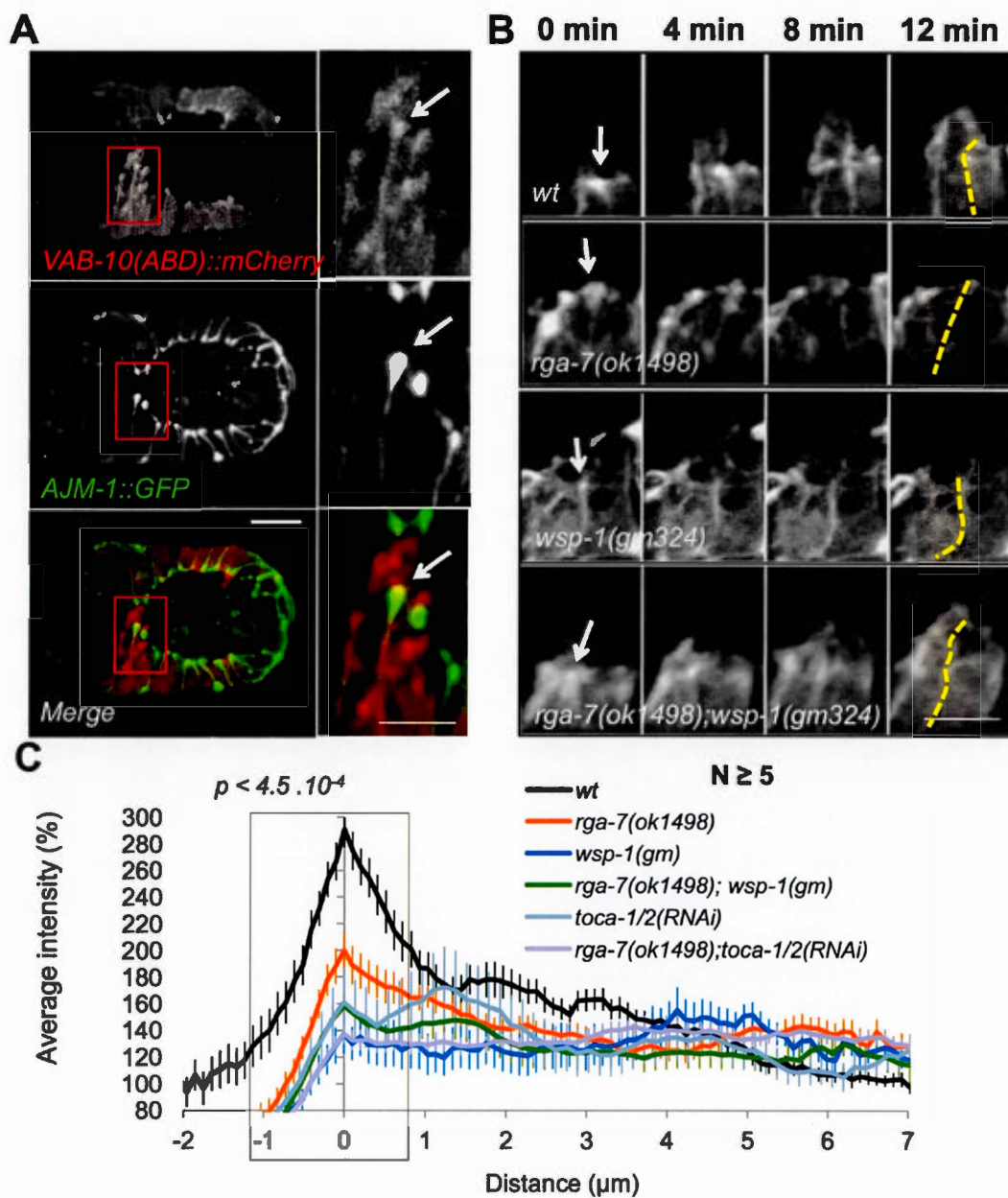


Supplemental Figure 2. Localization of RGA-7::GFP in adults.

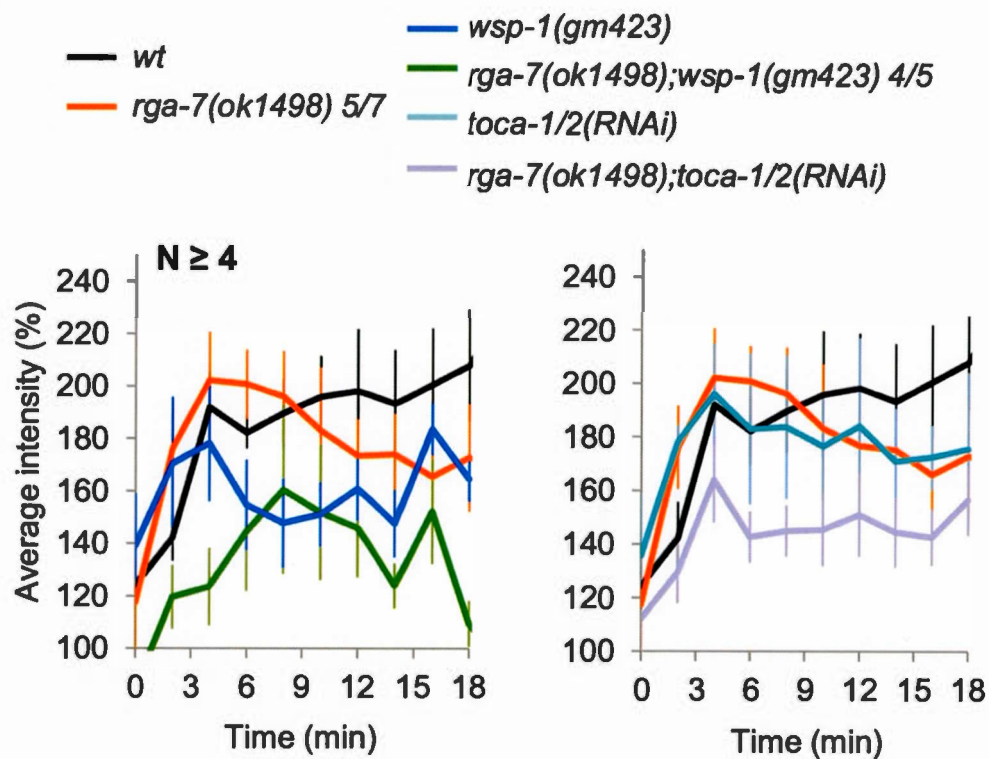
(A) *sajIs20* contains *rga-7lp* endogenous promoter, genomic DNA from exon 1 to 8 of *rga-7* and cDNA from exon 8 to the stop codon of the protein located in exon 20. It is expected to code for RGA-7l and m fused with GFP. *sajIs22* drives the expression of the same proteins under the control of the hypodermis-specific promoter *lin26p*. RGA-7::GFP fusion protein coded by *sajIs20* is expressed in number of cells in the head (B) and the tail (C) of adult hermaphrodites including neurons and the spermatheca (star; D). Embryos located in the uterus are indicated by arrow-heads (D).



Supplemental Figure 3. Relative expression of CFP::CDC-42 and CFP::RHO-1 transgenes. Average fluorescence intensity of CFP::CDC-42 and CFP::RHO-1 expressed under the control of the hypodermis-specific *lin-26p* promoter, and normalized against the auto fluorescence emitted by underlying neuroblasts. SEM are shown in error bars.



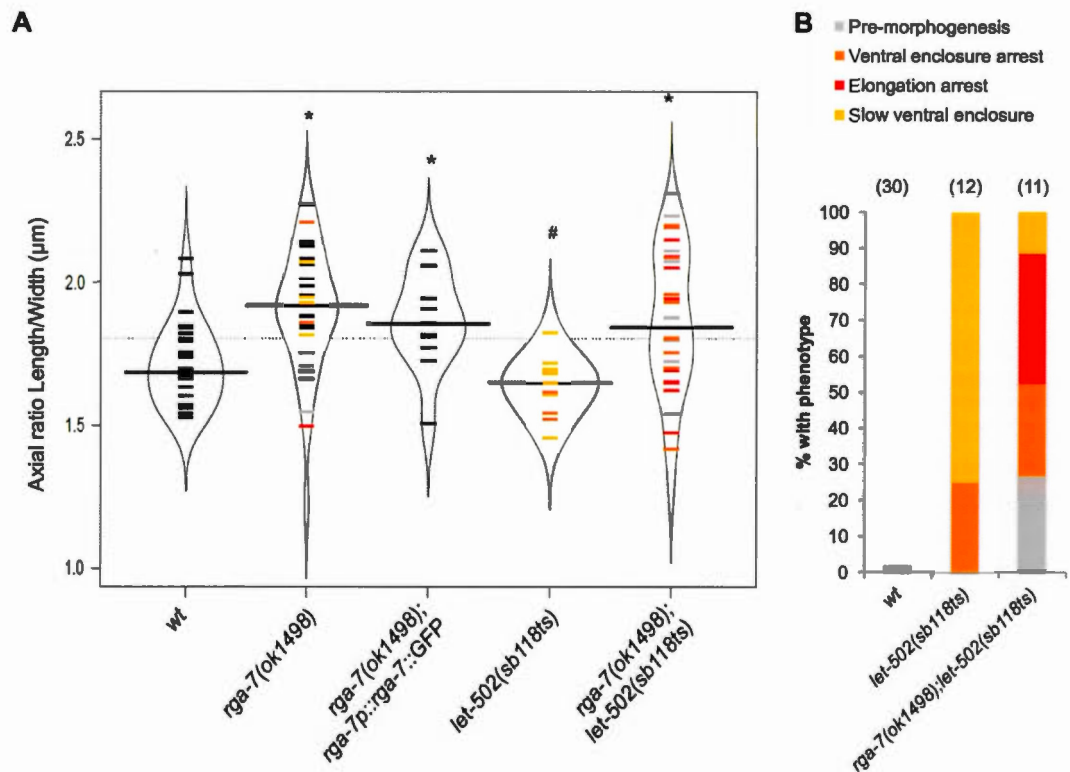
Supplemental Figure 4. *rga-7*, *wsp-1* and *toca-1/2* are required for filamentous actin accumulation at distal junctions between adjacent leading cell. (A) Relative distribution of filamentous actin and junctional proteins during ventral enclosure in *wt* animals expressing *lin-26p::VAB-10(ABD)::mCherry* and *AJM-1::GFP*. Zoomed sections on left panels are indicated by red boxes. (B) Filamentous actin accumulation at the leading edge of leading cells during ventral enclosure in *wt* or mutant embryos expressing *lin-26p::VAB-10(ABD)::GFP*. Scale bar = 5 μ m. Dashed yellow lines indicate line-scan used for panel C. (C) Distribution of filamentous actin from the edge (0 μ m; indicated by an arrow in B) to the proximal junction between adjacent leading cells for embryos with indicated genotype.

A**B**

JA accumulation ratio	time (min)	2	4	6	8	10	12	14	16
<i>rga-7(ok1498)</i>		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>wsp-1(gm423)</i>		1.0	1.0	1.0	0.8	0.8	0.8	0.8	0.9
<i>rga-7(ok1498);wsp-1(gm423)</i>		0.8	0.6	0.8	0.8	0.8	0.7	0.6	0.8
<i>toca-1/2(RNAi)</i>		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>rga-7(ok1498);toca-1/2(RNAi)</i>		1.0	1.0	0.8	0.8	0.7	0.8	0.7	0.7

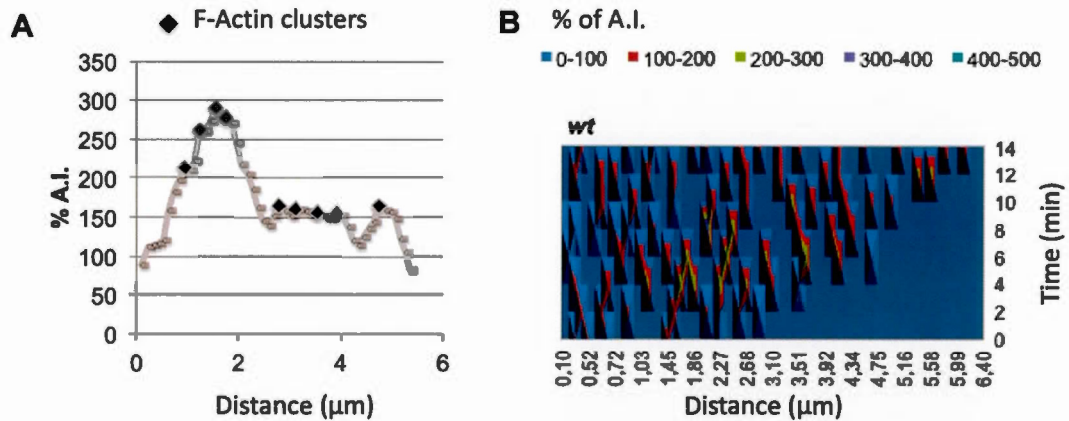
Supplemental Figure 5. *rga-7*, *wsp-1* and *toca-1/2* control filamentous actin accumulation at expanding junctions between contralateral leading cells in a synergistic manner.

(A) Quantification of actin accumulation at cell-cell junctions for the indicated genotypes, and at different times from collision (B) Junctional actin accumulation ratios of mutant vs *wt* are indicated when significantly different than 1. Ratios higher than 1 (red cells) indicate that actin accumulates significantly more at expanding junctions in mutants than in *wt*. White cells indicate that the actin-accumulation at expanding junctions is not significantly different in mutant and *wt* embryos.



Supplemental Figure 6. RGA-7's function during ventral enclosure is independent from its function in spermatheca.

(A) Axial ratios measured for embryos of shown genotypes are displayed as Bean Plot distributions. Axial ratios are the ratio of the length by the width of eggshells measured in embryos observed using DIC microscopy. Each line in the Bean Plot represents an embryo and the dominant phenotype expressed by these embryos is color coded. Black bars correspond to embryos with *wt* phenotype. **(B)** Percentage of embryos with indicated phenotypes in populations of *wt* and mutant embryos displaying normal eggshell (axial ratio between 1.5 and 1.8).



Supplemental Figure 7. Distribution of actin clusters at cell-cell junctions (A) Position of actin clusters (black diamonds) identified as peaks of fluorescence intensity. (B) Relative positioning of actin clusters at expanding junctions from collision between contralateral leading cells (time = 0 min). The distance is measured from anterior to posterior of expanding junction in micrometers.

Supplementary Data

Molecular structure and expression of *rga-7*

Embryos were purified using hypochlorite treatment from a mixed worm population. DNA and total RNA were purified from embryos using DNAzol (Invitrogen) and Trizol-chloroform solution (Invitrogen). PCRs and RT-PCR were done using either homemade DNA polymerase and ThermoScript-Reverse transcriptase (Invitrogen) with specific primers (Fig. S6 C and D). Agarose electrophoresis was used to assess the size of the amplicons and to identify their exon/intron composition (Fig. S1 C and D). This analysis revealed that *rga-7* codes for at least three transcripts, *rga-7l*, *m* and *s* generated from alternative transcription initiation at exon 1, 4 and 12 (Fig. S1 A, C and D). Cis-regulatory elements for the regulation of expression of *rga-7m* may then be present in introns located around the exon 4. Messenger RNA containing exon 1 (E1) and 4 (E4), which are specific exons for *rga-7l*, and *m* transcripts respectively, were detected by RT-PCR from total RNA purified from embryos (Fig. S1). This revealed that these two transcripts are expressed in embryos.

***rga-7(ok1498)* displays a zygotic effect during ventral enclosure independent from its function in spermatheca**

rga-7(ok1498) was recently used to study the function of *rga-7*, also called *spv-1*, in the control of oocyte expulsion from the spermatheca to the uterus (Pei Y. Tan and Zaidel-Bar, 2015b). This study revealed that animals, received from the CGC and

backcrossed twice with *wild-type* (*wt*), lay 41% dead embryos with most of these dead embryos displaying aberrant spherical eggshell morphology (Pei Y. Tan and Zaidel-Bar, 2015b). It also stated that observed Emb results from defects in the spermatheca.

After more than four backcrosses of mutant hermaphrodites obtained from the CGC with *wt* males, we observed that *rga-7(ok1498)* carrying animals laid $27.9\% \pm 3.5$ SEM dead embryos (Fig. 1 A). We also tested whether the *rga-7* defects observed during embryonic development were maternal or zygotic effects. To do so, we measured the Emb of the progeny from *rga-7(ok1498)* hermaphrodites mated with *wt* males and observed that this progeny did not significantly express any Emb compared to *wt* hermaphrodites (Fig. S1 B). This suggests that the Emb displayed by *rga-7(ok1498)* animals was due to a zygotic requirement of *rga-7*. In support of this, we detected *rga-7* transcripts from purified embryos using reverse-transcription and polymerase-chain reaction (PCR) (Fig. S1 C and D; see Methods). These results are in contradiction with previously published results (Pei Y. Tan and Zaidel-Bar, 2015b).

We also observed a significant synergism between *rga-7(ok1498)* and *let-502(sb118ts)* alleles when ventral enclosure defects were examined (Fig. 2 B). In opposition, Tan et al., observed a significant alleviation of spermatheca defects associated with *rga-7(ok1498)* in animals carrying an hypomorphic allele for *let-502* (Pei Y. Tan and Zaidel-Bar, 2015b). This suggests that *rga-7* and *let-502* have different functional relationships in spermatheca and

in embryos during ventral enclosure. Consequently, their function at these stages and tissues is uncorrelated.

In order to unequivocally show that ventral enclosure defects observed in *rga-7(ok1498)* were not due to a potential alteration of the eggshell resulting from excessive spermatheca contraction, we assessed the correlation between ventral enclosure defects and spermatheca hypercontraction. According to Tan et al. study, spermatheca hypercontraction observed in *rga-7(ok1498)* is due to the hyperactivation of RHO-1 GTPase and is consequently significantly reduced in animals carrying *let-502* hypomorphic allele (Pei Y. Tan and Zaidel-Bar, 2015b). Consequently, we expected that embryos from hermaphrodites carrying strong loss-of-function alleles for both *rga-7* and *let-502* would be subjected to reduced squeezing within spermatheca during ovulation than *rga-7(ok1498)* embryos. We then compared the axial ratio (corresponding to the length versus width of the eggshell) of *let-502(sb118ts)*, *rga-7(ok1498)* and *rga-7(ok1498);let-502(sb118ts)* double mutant embryos at 25.5°C (Fig. S6 A). This study revealed that *let-502* embryos display similar axial ratio than *wt* (t-test; *p-value* = 0.112; N = 17). The vast majority of these embryos (75%) display ventral enclosure delay, and 25% arrest their development during ventral enclosure (Fig. 2 B and Fig. S6 A and B). *rga-7(ok1498)* animals display significantly more elongated eggshell than *wt* (t-test *p-value* = 0.0001; N = 30; Fig. S6 A). It should be noted that in the study by Tan et al. *rga-7(ok1498)* animals arresting their development as embryos tend to display axial ratios lower than *wt* and not larger (Pei Y. Tan and Zaidel-Bar, 2015b). The axial distribution of *rga-*

7(ok1498); let-502(sb118ts) embryos was variable with 39.3% (11 of 28) of these embryos displaying axial ratio within a *wt* range (between 1.5 and 1.8; Fig. S6 A). In addition, *rga-7;let-502* embryos that do not display any eggshell defects (axial ratio between 1.5 and 1.8; N=11), display stronger ventral enclosure defects than *let-502* embryos with a similar axial ratio (Fig. S6 B). This demonstrates that *rga-7* aggravates ventral enclosure defects of *let-502* embryos independently from its function in spermatheca. Therefore, this strongly suggests that spermatheca and ventral enclosure defects are uncorrelated. To further support these conclusions, we assessed whether the *sajIs22[rga-7p::rga-7::GFP]* transgene, carrying the expression of RGA-7::GFP fusion proteins under the control of *rga-7p* endogenous promoter that rescues *rga-7(ok1498)* ventral enclosure defects (Fig. 1 B and F) also rescues the elongated shapes of eggshell observed in *rga-7(ok1498)* embryos. This study revealed that the eggshells of *rga-7(ok1498); sajIs22[rga-7p::rga-7::GFP]* embryos displayed an elevated axial ratio (1.87 ± 0.03 SEM; Fig. S3), which was significantly different than *wt* (t-test *p-value* = 0.003) and not significantly different than *rga-7(ok1498)* embryos (Mean 1.90 ± 0.03 ; N = ; t-test *p-value* = 0.67; Fig. S3). This suggests that the expression level of RGA-7::GFP in spermatheca may not fully rescue the function of *rga-7* during oocyte expulsion to the uterus in *ok1498* animals. Note that all our transgenic animals were generated using bombardment and are integrated arrays while Tan et al study uses transgenic carrying extrachromosomal arrays, with presumably higher expression levels. The expression of *rga-*

7p::rga-7::GFP fully rescued ventral enclosure defects in *rga-7(ok1498)* (Fig. 1 B and F) suggesting that expression of ventral enclosure defects does not correlate with alteration of eggshell morphology in *rga-7(ok1498)* animals. Taken together, we conclude that the ventral enclosure defects observed for embryos carrying *rga-7(ok1498)* allele is not caused by the observed elongated shape of eggshells associated with this allele.

RGA-7, WSP-1 and TOCA-1/2 are required for filamentous actin accumulation at distal cell junctions between adjacent leading cells

In mammals, N-WASP and TOCA1 were shown to control actin cytoskeleton dynamics during clathrin-mediated endocytosis at the cell-cell junctions of epithelial cells (Bu et al., 2010). Therefore, we assessed the distribution of the actin filaments at distal and proximal junctions between adjacent leading cells (light blue and dark blue lines, Fig. 4 A) in *wt* and mutant embryos during ventral enclosure. We first assessed the relative positioning and accumulation of filamentous actin at distal and proximal junctions of animals expressing the actin-binding probes VAB-10(ABD)::mCherry together with the junctional marker AJM-1::GFP in hypodermis during ventral enclosure (Fig. S4 A). This revealed that filamentous actin (F-actin) and junctional proteins accumulate at the edge of distal junctions in *wt* embryos (arrow, Fig. S4 A) and decreases gradually towards the proximal junction. Similar F-actin distribution was observed in *wt* animals expressing VAB-10(ABD)::GFP (Fig. S4 B and C). In supplemental Figures 4 A and

B, the arrows indicate the edge of the junctions between adjacent leading cells (distance = 0 μm ; Fig. S4 C).

The accumulation of F-actin was significantly reduced at distal junctions in *rga-7(ok1498)*, *wsp-1(gm423)* and *toca1/2(RNAi)* as well as in double mutant embryos compared to *wt* (one-way ANOVA; distances between -1 and 1 μm ; *P-value* < $4.5 \cdot 10^{-4}$; Fig. S4 C). These results suggest that *rga-7*, *wsp-1* and *toca-1/2* control the accumulation of actin filaments at the distal junction between leading cells. These data also suggest that the parallel pathway driving the formation of actin-rich protrusions in LCs in *rga-7(ok1498);wsp-1(gm423)* and *rga-7(ok1498); toca-1/2(RNAi)* double mutants does not drive the accumulation of F-actin at distal junctions as efficiently as *rga-7/wsp-1/ toca-1/2* pathway(s).

RGA-7, WSP-1 and TOCA-1/2 control the accumulation of actin filaments at the expanding junctions between contralateral leading cells

We measured the accumulation of F-actin at new junctions expanding between contralateral LCs in *wt* and mutant animals (Fig. S5 A). We also calculated the rate of F-actin accumulation at expanding junctions in mutant vs *wt* over time (Fig. S5 B). This analysis revealed that F-actin accumulates at the expanding junctions in a similar manner in *wt*, *rga-7(ok1498)* and *toca-1/2(RNAi)* animals (Fig. S5 B). However, F-actin accumulation was reduced at expanding junctions between 8 and 16 minutes after cell

collision in *wsp-1(gm324)* (Fig. S5 A and B; one-way ANOVA; *P-value* = 0.0015), and between 2 and 16 min in *rga-7(ok1498)*; *wsp-1(gm324)* and *rga-7(ok1498)*; *toca-1/2(RNAi)* animals (Fig. S5 A and B; One-way ANOVA; *P-value* = $1.3 \cdot 10^{-5}$ and $1.6 \cdot 10^{-6}$). These data suggest: (i) that functional alteration of *rga-7* or *toca-1/2* alone does not significantly reduce the accumulation of F-actin at expanding junctions between contralateral cells; (ii) that *rga-7*, *wsp-1* and *toca-1/2* control the accumulation of F-actin at these junctions in a synergistic manner; (iii) that F-actin accumulation is regulated differently by *rga-7*, *wsp-1* and *toca-1/2* at distal junctions between adjacent co-migrating cells and at expanding junctions between contralateral cells.

Supplementary methods

Generation of transgenic animals

All transgenic animals were generated through biolistic bombardment of *unc-119(ed3)* animals, using a PDS-1000/He system with the Hepta adaptor (Bio-Rad) as previously reported (Berezikov et al., 2004). At least three independent lines were isolated and characterized per construct. The *rga-7* promoter containing 5.0 kb upstream of the ATG initiation codon located in exon 1 of *rga-7* was amplified from genomic DNA purified from *C. elegans* populations using genomic DNA purification kit (Qiagen). Amplicons were recombined using Gateway cloning technology (life technology) in pDONRP4P1R vector and sequenced. The RGA-7 coding sequence was generated through the in-frame fusion of genomic DNA from initiation codon located in exon 1 to the

beginning of exon 8, with the cDNA sequence from exon 8 to the stop codon located in exon 20. cDNA was amplified using reverse-transcription and PCR using Thermoscript II-HiFi kit (Life technologies) from total RNA purified from embryos. Coding sequence was inserted in the pDONR201 vector and sequenced. pDONRP4P1R-*rga-7p* and pDONR201-*rga-7* containing *rga-7* promoter and coding sequences respectively were recombined with pMB14 (Dupuy et al., 2004) to generate *sajIs22[rga-7p::rga-7::GFP; unc-119^R]* carrying animals. Similarly, *sajIs20[lin-26p::rga-7::GFP; unc-119^R]* was generated through recombination of pDONRP4P1R-*lin-26p* containing 5kb of the *lin-26* promoter (Martin et al., 2014b), pDONR201-*rga-7* and pMB14. pDONR201 containing sequences coding for CFP::RHO-1 and CFP::CDC-42 were generated using PCR by overlapping extension approach (S. Jenna et al., 2005), with CFP and GTPase sequences amplified from *pDESTeCFP* (Simpson et al., 2000) and pGEX2TK-*rho-1* and pGEX2TK-*cdc-42* (S. Jenna et al., 2005) respectively. DNA constructs used to generate *sajIs29[lin-26p::CFP::rho-1::3'UTR; unc-119^R]* and *sajIs30[lin-26p::CFP::cdc42::3'UTR; unc-119^R]* were obtained through recombination of pDONRP4P1R-*lin-26p*, pDONR201-CFP-*rho-1* or pDONR201-CFP-*cdc-42*, pCM5.37 containing the *unc54* 3'UTR (Addgene) and pCG150 destination vector (Addgene). *wsp-1* CRIB domain (cDNA coding for 78 aminoacids from position 230 to 308 of WSP-1) was cloned in pDONR201 and recombined together with pDONRP4P1R-*lin-26p* in pULSRG1 (containing attB4-ccdB-attB2 followed by mCherry-pie-1 3'UTR; kindly provided by Dr Ian Hope, Univ. Leeds, UK). The

resulting vector was used to generate *sajIs31[lin-26p::wsp-1(CRIB)::mCherry]* transgenic animals.

Assessment of maternal vs zygotic effect of *rga-7(ok1498)*

The potential maternal effect of *ok1498* was assessed by setting several crossing plates, each containing three males and one hermaphrodite (L4 stage) of the desired genotypes. Hermaphrodites were allowed to lay eggs for 24h and removed from the plate. The eggs laid were counted upon removal of the hermaphrodites and after 24 hours incubation at 20°C enabling the quantification of dead embryos. Animals hatched from these plates were allowed to develop until adulthood and the male versus hermaphrodite ratio established. Only progeny from plates with approximately 50% of males were considered as to have resulted from efficient mating.

RNA interference (RNAi) treatment

The pL4440 constructs containing *toca-1* and *toca-2* sequences were retrieved from the Genome-wide library (Kamath et al., 2003) and sequenced. HT115 bacteria transformed with pL4440 vectors were plated on LB ampicillin (30mHT115 bacteria transformed with pL4440 vectors were plated on LB ampicillin (30 20°C enabling the quantification of dead embryos. Animals hatched from these plates were allowed to develop until adulthood and the male versus hermaphrodite ratio established (containing pL4440-*toca-1* and pL4440-*toca-2* in a 1:1 ratio) were pelleted and resuspended in 300m00 a 1:1 ratio) were pelleted and resuspended in 300plated

on LB ampicillin (30 20°C enabling the quantification of dead embryos. Animals hatched from these suspended in 200msuspended in L1 worms synchronized of induced bacteria at 20°C for 48-60 hours before proceeding with microscopy analysis.

Image analysis

Fluorescence quantification was done on a Z-projection of 7 to 12 planes using ImageJ Z-stack tool (average intensity mode). ImageJ was also used to quantify fluorescent emission along the cell-cell junctions. The junctions between adjacent co-migrating leading cells were identified using F-actin binding probes. The segmented line tool was used to trace this junction and the plot profile tool in ImageJ was used to obtain an intensity scan. This scan was subsequently analysed in excel (Microsoft). Visual inspection of the intensity scan profiles and the picture enabled the identification of the edge of the junction (characterized by a peak of intensity followed by either a reduction of fluorescence or a plateau). The edge was defined as the 0 mprofiles and the picture enabled the identification of the edge of the junction (characterized by a peak of intensity followed by either a rend (emitted from underlying neuroblasts) and expressed as a percentage of the fluorescence mean measured on the total area covered by the two leading cells using ImageJ "quantification tools". Clusters were defined as peaks of fluorescent intensity along the junction (Fig. S7 A). The persistence of these clusters over time as shown for expanding junction (Fig. S7 B) allowed us to consider them as real clusters

(local zone with enriched proteins) instead of artefacts of microscopic fluorescent fluctuations.

Ruffles ratios were measured by the division of the protrusion perimeter (thick red or blue lines; Fig. 3 I) by cell width (thin red or blue lines; Fig. 3I) as described by (Sheffield et al., 2007). These measurements were done using ImageJ software.

Statistical analysis

All *P-values* indicated in the test were obtained using two-tailed Student t-test computed using Excel tools except when otherwise indicated. Normal distributions of our data were assessed using Lilliefors test (<http://in-silico.net/tools/statistics/lilliefortest>). Two-way and one-way ANOVA were computed using Statplus tools (Microsoft for Mac). Genotype effect was assessed using two-way ANOVA in non-interaction conditions and consequently required the identification of subsets of data presenting no significant time or distance effect (*P-values* > 0.05). Once the subset of data selected, one-way ANOVA tested the genotype effect on our data. A minimum of 3 measurements per embryo and a minimum of 3 embryos were used for each analysis.

Supplemental References

Berezikov, E., Bargmann, C.I., and Plasterk, R.H. (2004). Homologous gene targeting in *Caenorhabditis elegans* by biolistic transformation. *Nucleic acids research* 32, e40.

Bu, W., Lim, K.B., Yu, Y.H., et al. (2010). Cdc42 Interaction with N-WASP and Toca-1 Regulates Membrane Tubulation, Vesicle Formation and Vesicle Motility: Implications for Endocytosis. *PLoS ONE* 5, e12153.

Dupuy, D., Li, Q.R., Deplancke, B., et al. (2004). A first version of the *Caenorhabditis elegans* Promoterome. *Genome research* 14, 2169-2175.

Jenna, S., Caruso, M.E., Emadali, A., et al. (2005). Regulation of Membrane Trafficking by a Novel Cdc42-related Protein in *Caenorhabditis elegans* Epithelial Cells. *Molecular Biology of the Cell* 16, 1629-1639.

Kamath, R.S., Fraser, A.G., Dong, Y., et al. (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 421, 231-237.

Martin, E., Harel, S., Nkengfac, B., et al. (2014). *pix-1* controls early elongation in parallel with *mel-11* and *let-502* in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 9, e94684.

Sheffield, M., Loveless, T., Hardin, J., et al. (2007). *C. elegans* Enabled Exhibits Novel Interactions with N-WASP, Abl, and Cell-Cell Junctions. *Current Biology* 17, 1791-1796.

Simpson, J.C., Wellenreuther, R., Poustka, A., et al. (2000). Systematic subcellular localization of novel proteins identified by large-scale cDNA sequencing. *EMBO reports* 1, 287-292.

Tan, Pei Y., and Zaidel-Bar, R. (2015). Transient Membrane Localization of SPV-1 Drives Cyclical Actomyosin Contractions in the *C. elegans* Spermatheca. *Current Biology* 25, 141-151.

CHAPITRE III

MÉTHODES ET RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

Des méthodes et résultats n'ont pas été montrés dans l'article présenté au Chapitre II. Ci-dessous seront donc décrits les méthodes supplémentaires utilisées et les résultats supplémentaires obtenus au cours de mon étude de *rga-7* et son rôle pendant la fermeture ventrale.

3.1 MÉTHODES SUPPLÉMENTAIRES

Souches et méthodes de culture

Toutes les souches sont conservées en condition standard à 20°C. Les souches portant les mutations suivantes: *rga-7(ok1498) II*, *pak-1(ok448) X* et *pix-1(gk416) X*, proviennent du *Caenorhabditis* Genetic Center (CGC). Les souches *rga-7(ok1498) II*; *pak-1(ok448) X* et *rga-7(ok1498) II*; *pix-1(gk416)* furent générées en croisant des hermaphrodites *pak-1(ok448) X* ou *pix-1(gk416) X* avec des mâles *rga-7(ok1498) II* tandis que les souches *rga-7(ok1498) II*, *sajIs27[rga-7sp::rga-7s::GFP]* et *rga-7(ok1498) II*; *sajIs26[rga-7lp::rga-7l/mΔF-BAR::GFP]* furent obtenues en croisant des hermaphrodites *sajIs27[rga-7sp::rga-7s::GFP]* ou *sajIs26[rga-7lp::rga-7l/mΔF-BAR::GFP]* avec des mâles *rga-7(ok1498) II*. Le génotypage de la progénie a été effectuée par

isolation de fluorescence pour les souches *sajIs27[rga-7sp::rga-7s::GFP]* et *sajIs26[rga-7lp::rga-7l/mΔF-BAR::GFP]*. Les mutations des gènes *rga-7*, *pak-1* et *pix-1* ont, pour leur part, été identifiées par PCR (Polymerase Chain Reaction).

Tableau I. Amorces pour génotypage. Paires d'amorces utilisées pour identifier les mutations présentes dans les souches croisées (de 5' à 3') ainsi que les tailles attendues pour les génotypes mutant et sauvage. S = Sens, AS = Anti-Sens et pb = paire de base. Il est à noter que pour augmenter l'efficacité de détection, une troisième amorce sens fut utilisée pour *rga-7(ok1498)*. L'amorce étant dans la mutation, une bande sauvage est détectable lorsqu'au moins un allèle sauvage est présente dans le génome de la population analysée. Les deux amorces qui encadrent la mutation permettent, pour leur part, de détecter l'allèle mutante en donnant une bande à 980 bp.

Souche	Amorces	Taille sauvage (pb)	Taille mutant (pb)
<i>pak-1(ok448)</i>	S : GCGGTAGCAGTTGAGTCATC AS : ATTGTTCTCCCGCTATCCC	1800	500
<i>pix-1(gk416)</i>	S : CGTTCTATCGATTCCATCGAC AS : CGAAATTCCCAACCAACGTAC	1177	586
<i>rga-7(ok448)</i>	S : TAATTCGCGCAATCTATGATCATC AS : GTTTGTGCTCACGGAGTTTAT S : AGCTTGCTTTCCAAGGGTTTG	1500 1250	980

Génération des lignées transgéniques

Les souches *unc-119(ed3); sajIs27[rga-7sp::rga-7s::GFP]* et *unc-119(ed3); sajIs26[rga-7lp::rga-7l/m Δ F-BAR::GFP]* ont été générées par bombardement.

Pour ce faire, les constructions ont été générées par amplification PCR en utilisant des promoteurs endogènes spécifiques des deux constructions, le promoteur *rga-7l* (5kb en amont du codon initiateur situé dans l'exon 1) et le promoteur *rga-7s* (5kb dans l'intron entre les exons 10 et 11, en amont du premier ATG de la forme courte situé dans l'exon 11).

Le cDNA de la forme courte, *rga-7s*, a été également amplifiée à partir du cDNA de la forme longue en utilisant des amorces spécifiques (Tableau II). La construction *rga-7l/m Δ F-BAR*, elle, fut obtenue à partir de la construction *rga-7l/m* dans laquelle les domaines F-Bar et *coil-coiled* furent tronqués. Pour ce faire, des amorces à bouts collants ont été utilisées afin de créer un fragment en 5' de 3310 pb s'arrêtant juste avant le domaine *coil-coiled* et un fragment en 3' de 1680 pb commençant juste après le domaine F-Bar. L'ensemble a été fusionné tel que décrit dans le Tableau II pour créer une séquence avec un cadre de lecture ouvert contenant la délétion souhaitée.

L'ensemble des constructions a été amplifié par PCR en utilisant la polymérase Taq HIFI (Life technologies) selon les instructions du fabricant.

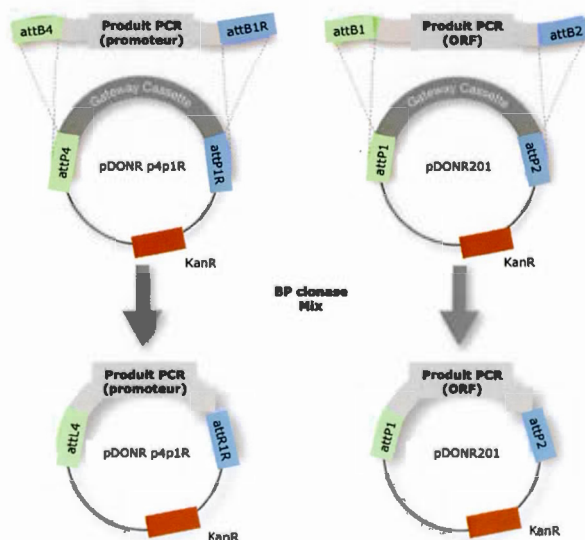
Tableau II. Séquences des amorces utilisées pour les constructions des lignées transgéniques. Les paires d'amorces utilisées (de 5' à 3') pour générer les constructions *sajIs27[rga-7sp::rga-7s::GFP]* et *sajIs26[rga-7lp::rga-7l/mΔF-BAR::GFP]*. Les deux fragments de *sajIs26* sont décrits indépendamment puis furent mis bout à bout par fusion en utilisant les amorces précisées. La séquence de recombinaison pour les vecteurs Gateway est indiquée en **rouge** et les bouts chevauchants pour la fusion en **bleu**. S= Sens, AS = Anti-Sens et pb = paire de base.

Fragment	Amorce
<i>rga-7lp</i>	S:GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGTTATTAAACGTGGAGTAGAGCC AS:GGGGACTGCTTTTTTTGTACAAACTTGTCCGACTTGATTCAGTCAACTTTC
<i>rga-7sp</i>	S:GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGTCATCATCATCGTCCGTGCTC AS:GGGGACTGCTTTTTTTGTACAAACTTGTCTGCGCGGATACTTTTCTATTAAGG
<i>rga7l/mΔF-BAR 5'</i>	S:GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGTCGTCGACGAGCAGTATA AS:GAATATGAGCTCACGAAGTCGATCAATCTCCATCACTTTTTTCAGT
<i>rga7l/mΔF-BAR 3'</i>	S: ACTGAAAAAGTGATGGAGATTGATCGACTTCGTGAGCTCATATTC AS:GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAAGACGTGTCGATTCAACCTTATC
<i>rga7l/mΔF-BAR complet</i>	S:GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGTCGTCGACGAGCAGTATA AS:GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAAGACGTGTCGATTCAACCTTATC
<i>rga-7s</i>	S:GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGACTGGCCGAATCATGATA AS:GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAAGACGTGTCGATTCAACCTTATC

Les deux fragments d'ADN furent par la suite insérés dans le vecteur pDONR p4p1R pour les promoteurs et pDONR201 pour les ORFs (Open Reading Frame) en utilisant la recombinaison BP Gateway (Invitrogen) (Figure 20). Les séquences sont par la suite

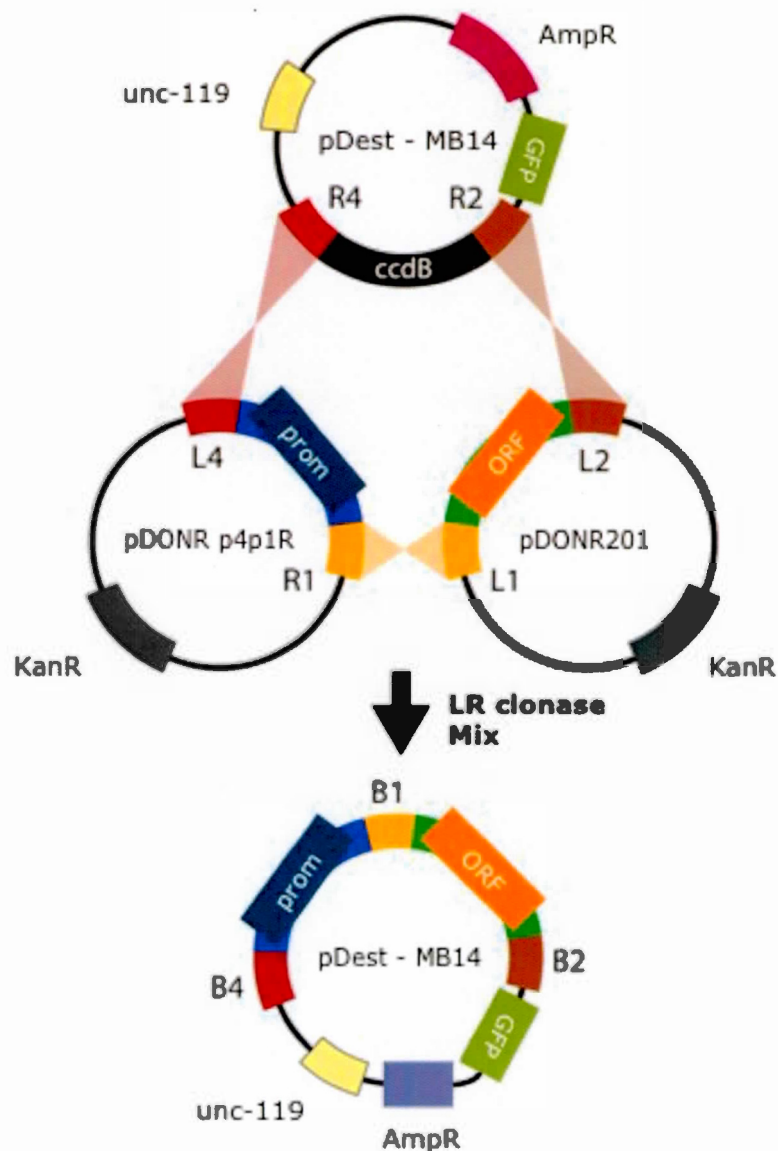
transférées dans le vecteur pMB14 permettant l'expression de la protéine en fusion avec la GFP (Green Fluorescent Protein) sous le contrôle du promoteur désiré (Figure 21). Ces constructions ont été intégrées dans le génome de lignées *unc-119(ed3)*, en utilisant un système PDS-1000/He avec adaptateur Hepta (Bio-Rad) comme décrit par Berezikov *et al.* (Berezikov *et al.*, 2004). Lorsque l'insertion est réussie, la souche *unc-119(ed3)* présente un phénotype sauvage car les vecteurs constructions contenant une copie fonctionnelle de *unc-119* permettent un sauvetage de phénotype lors de leur insertion dans le génome.

Figure 20. Réaction de recombinaison Gateway (BP). Les deux fragments PCR obtenus : les promoteurs, *rga-7lp* ou *rga-7sp* et les ORFs, *rga-7s* ou *rga7l/mΔF-BAR* furent recombines respectivement dans les plasmides donneurs pDONR p4p1R et pDONR201 pour créer des clones d'entrée à l'aide du mix enzymatique BP clonase (Gateway®). KanR = résistance à la Kanamycine.



Adapté de (Boulin, 2006)

Figure 21. Réaction de recombinaison Gateway (LR). Les deux clones d'entrées dans les vecteurs pDONR p4p1r et pDONR201 (le promoteur, *rga-7lp* ou *rga-7sp* et l'ORF, soit *rga-7s* ou *rga7l/mΔF-BAR*) furent recombinaés dans le vecteur destination pDest-MB14 à l'aide du mix enzymatique LR clonase (Gateway®). KanR = résistance à la Kanamycine, AmpR = résistance à l'ampicilline.



Adapté de (Boulin, 2006)

Les constructions furent transformées dans des bactéries compétentes *E.coli* DH5 α et les colonies ayant intégrées les plasmides sont sélectionnées en les striant sur des plaques de LB (Lisogeny Broth) contenant l'antibiotique approprié : kanamycine (30 μ g/ml) pour les BP et ampicilline (100 μ g/ml) pour les LR.

Les clones positifs sont isolés puis soumis à une PCR avec amorces spécifiques afin de s'assurer de la présence des constructions puis séquencés pour confirmer le cadre de lecture.

Phénotypage des mutants et microscopie 4-dimensions

Pour déterminer la létalité embryonnaire, 10-12 hermaphrodites furent isolés sur des plaques NGMensemencées avec des bactéries OP50 comme source de nourriture. Ils furent laissés à 20°C pendant 5 à 6 heures pour pondre puis enlevés de la plaque. Le lendemain, les œufs morts sont observés et comptés au microscope à dissection. Le stade précis d'arrêt embryonnaire est ensuite confirmé par microscopie 4-dimensionnelle. Les vers sont disséqués pour isoler les embryons qui sont ensuite montés sur des pads de M9/agarose 3% et les lamelles sont scellées avec de la gomme résine (Pébéo). L'élongation est enregistrée en utilisant la microscopie 4-dimensions (3D et temps), en enregistrant un plan-Z toutes les 2 minutes pendant 10 heures à 20°C sur un microscope Leica DM5500 avec un objectif à immersion de 63X par illumination différentielle par contraste d'interférence (DIC). Les images ont été

enregistrées avec le logiciel d'imagerie Leica LAS AF. Ces films ont permis d'identifier les défauts morphologiques pendant le développement embryonnaire pour chaque génotype sur au moins 50 embryons. À partir de ces acquisitions, le délai de fermeture ventrale a également été calculé. Ce dernier est défini comme une durée supérieure à une heure pour terminer le processus à partir du moment où les cellules meneuses sont observables en périphérie antérieure de l'embryon.

3.2 RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

Les résultats supplémentaires pour l'étude du rôle de RGA-7 lors de la fermeture ventrale qui furent obtenus suite à ces manipulations sont présentés ci-après.

La létalité embryonnaire décrite dans les résultats suivants est représentée et définie par les catégories : (i) pré-morphogénèse, signifiant un arrêt des embryons avant les premières étapes de morphogénèse; (ii) arrêt en fermeture ventrale; (iii) arrêt au stade d'élongation et; (iv) rupture au cours de l'élongation tardive; (v) certains embryons ont été identifiés comme ayant des défauts de coquille entraînant en général la mort de l'embryon à différents stades du développement.

Importance du domaine F-Bar de RGA-7 dans sa fonction lors de la fermeture ventrale

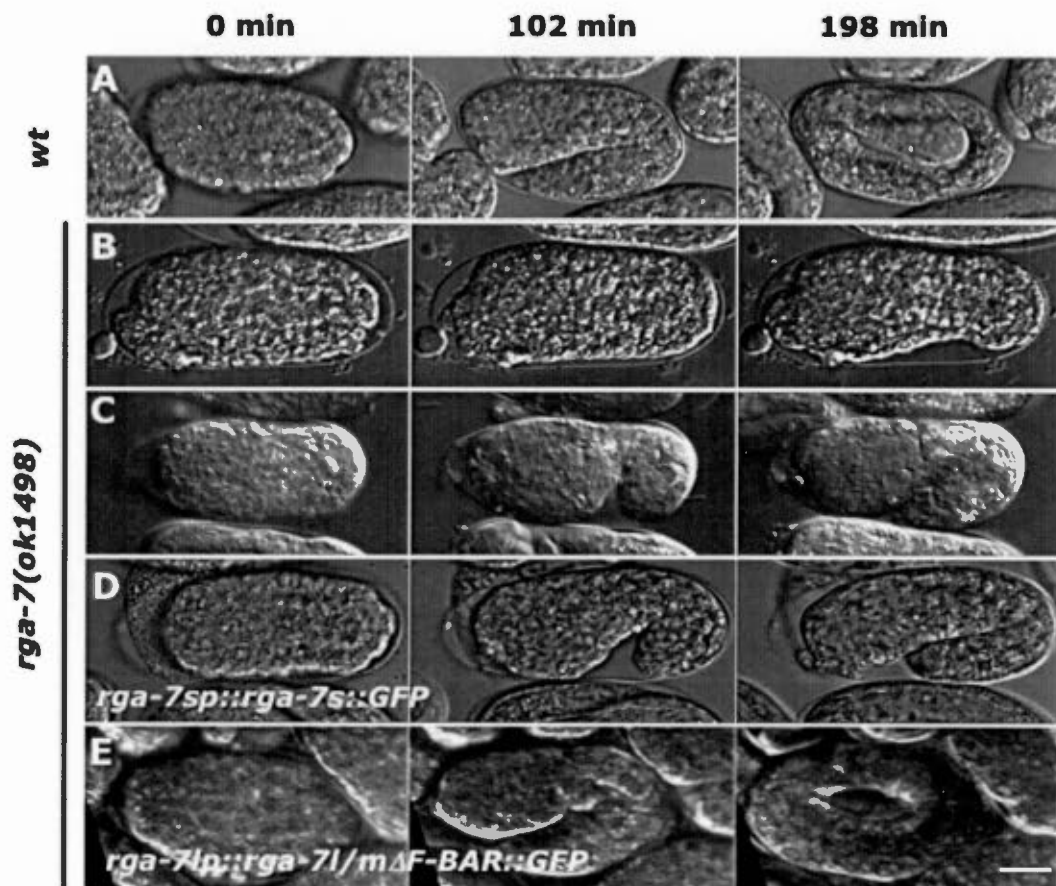
Le développement des embryons des souches transgéniques *sajIs27[rga-7sp::rga-7s::GFP]* et *sajIs26[rga-7lp::rga-7l/mΔF-BAR::GFP]* se déroule normalement sans aucune létalité embryonnaire ni défauts de morphogénèse (Figure 22 F).

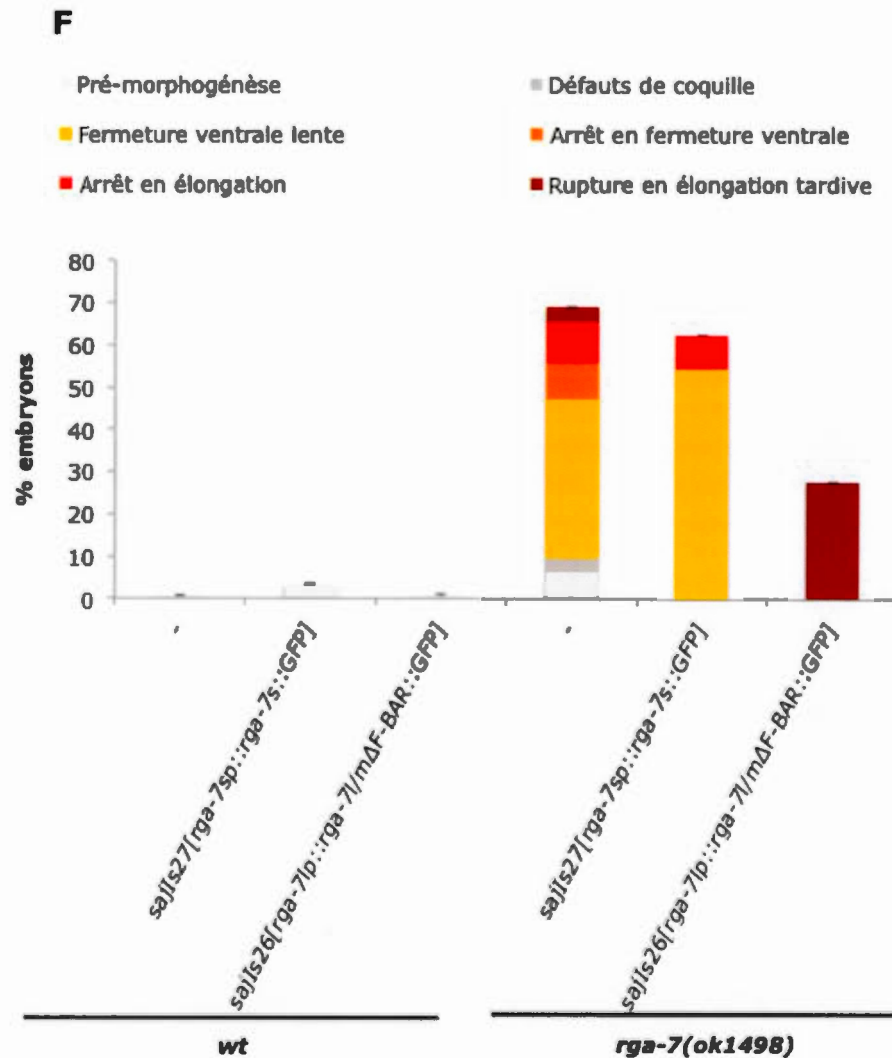
Les embryons *rga-7(ok1498);sajIs27*, issus du croisement entre la souche *sajIs27* et *rga-7(ok1498)*, présentent une fermeture ventrale lente dans 55% des cas ainsi que des arrêts en élongation pour 7% des embryons mais aucun autre défaut n'a été observé (Figure 22 D-F). Le nombre d'embryons présentant un délai en

fermeture ventrale est supérieur à celui des embryons *rga-7(ok1498)* avec 38% de retards en fermeture ventrale plutôt que 0% dans les *wt*. Par contre, la létalité embryonnaire associée à un arrêt en fermeture ventrale est totalement supprimée dans les transgéniques (Figure 22 F). Ceci suggère que l'expression de RGA-7s sous le contrôle de son promoteur endogène restaure partiellement la fonction de RGA-7 au cours de la fermeture ventrale. Il est à noter que la construction *sajIs27* est sous contrôle de son propre promoteur et que ce promoteur est différent de celui utilisé pour exprimer les formes RGA-7l et m dans le transgénique *sajIs26*. Il est donc possible que la plus faible expression de RGA-7s soit responsable du fait que *sajIs27* ne restaure pas complètement la fonction de RGA-7 dans les animaux mutants.

Les embryons *rga-7(ok1498);sajIs26* exprimant RGA-7l/m Δ F-BAR sous le contrôle du promoteur endogène des formes l/m, ne présentent plus aucun défauts de létalité associés à un arrêt en fermeture ventrale ou en élongation précoce, ni aucun délai en fermeture ventrale mais un nouveau phénotype létal de rupture en élongation tardive pour 28% des embryons (Figure 22 E et F). Ces résultats sont intrigants et suggèrent que le domaine F-BAR serait au moins partiellement fonctionnel au cours de la fermeture ventrale mais aurait aussi une fonction différente des formes mutantes exprimées dans le mutant *rga-7(ok1498)* et dans les animaux sauvages.

Figure 22. Le domaine F-Bar de RGA-7 n'est pas requis lors de la fermeture ventrale. Développement embryonnaire d'embryons sauvage (*wt*) (A), *rga-7(ok1498)* (B-C), *rga-7(ok1498); sajIs27[rga-7sp::rga-7s::GFP]* (D) et *rga-7(ok1498); sajIs26[rga-7lp::rga-7l/mΔF-BAR::GFP]* (E) observé par microscopie DIC à trois stades de développement. Temps = 0 minute correspond au temps où les cellules meneuses commencent à être vue ventralement, 102 minutes, pour l'embryon *wt*, au début de l'élongation tardive et 198 minutes au stade 3-fold. Barre = 10 μ m. Les pourcentages de létalité embryonnaire et défauts embryonnaires observés ont été mesurés pour chaque génotype (F)





RGA-7 contrôle la fermeture ventrale en parallèle de PIX-1 ET PAK-1

Sachant que PIX-1 et PAK-1 sont respectivement une GEF et un effecteur pour Rac/CED-10 et CDC-42, impliqués dans l'élongation embryonnaire (Gally et al., 2009; Zhang et al., 2011; Martin et al., 2014) des doubles mutants avec *rga-7(ok1498)* ont

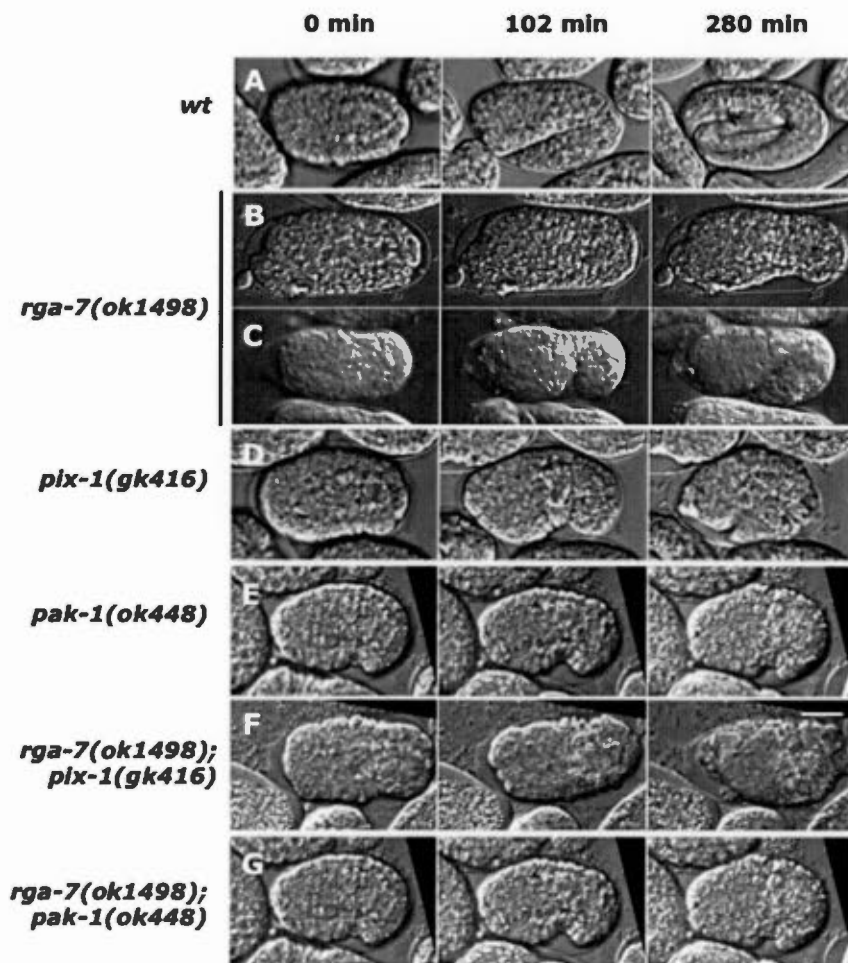
été générés afin de savoir si PIX-1 et RGA-7 pourraient réguler CDC-42 de façon antagoniste au cours de la fermeture ventrale.

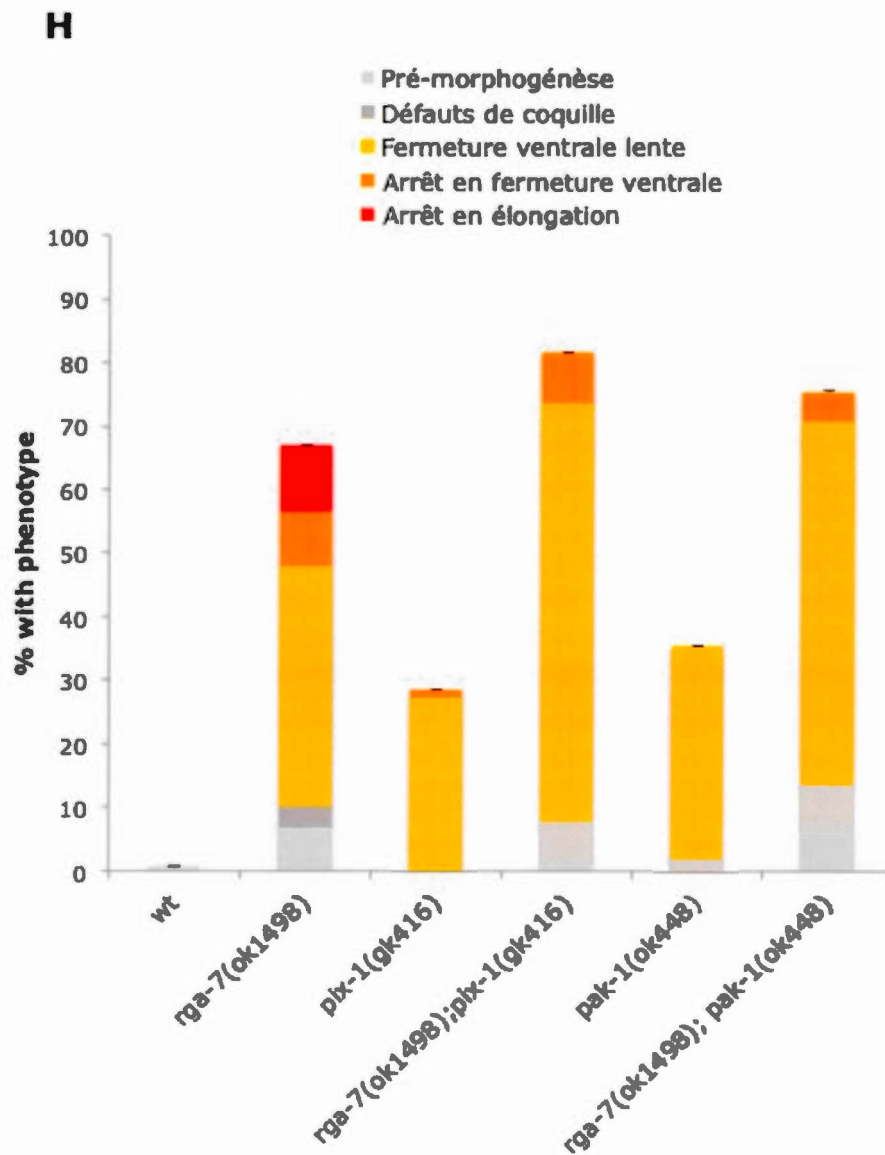
Les embryons *pix-1(gk416)* présentent une faible létalité embryonnaire de 9% alors que les embryons *pak-1(ok448)* n'en présentent pas mais les deux manifestent des délais en fermeture ventrale de respectivement 27,3 et 33,3% (Figure 23 D-E et J).

De plus, autant d'embryons du double mutant *rga-7(ok1498);pix-1(gk416)* meurent en fermeture ventrale (9%) que *pix-1(gk416)*, cependant 65,4% des embryons ont significativement plus de délais que *rga-7(ok1498)* (t-test; p-value= 0,04) (Figure 23 F et J). Ce pourcentage est légèrement supérieur à l'addition des pourcentages de délai pour chaque génotype parental de 32% pour *rga-7(ok1498)* et 27,3% pour *pix-1(gk416)* (t-test; p-value= 0,03), suggérant que RGA-7 et PIX-1 agiraient dans deux voies parallèles lors de la fermeture ventrale.

Les embryons du double mutant *rga-7(ok1498);pak-1(ok448)* démontrent 57,1% de délais en fermeture ventrale, ce qui est légèrement supérieur à l'addition des pourcentages de délais pour chaque génotype parental (65,3%) (Figure 23 G et J). D'autre part, 13,8% des embryons meurent pendant le développement précoce qui est supérieur à l'addition des pourcentages pour *rga-7(ok1498)* et *pak-1(ok448)*. Ceci montre une aggravation du phénotype (Figure 23 H) et suggère que RGA-7 agit aussi dans une voie de signalisation parallèle à PAK-1.

Figure 23. RGA-7 agit en parallèle de PIX-1 et PAK-1 lors de la fermeture ventrale. Développement embryonnaire d'embryons sauvages (*wt*) (A), *rga-7(ok1498)* (B-C), *pix-1(gk416)* (D), *pak-1(ok448)* (E), *rga-7(ok1498);pix-1(gk416)* (F) et *rga-7(ok1498);pak-1(ok448)* (G) observé par microscopie DIC à trois stades de développement. Temps = 0 minute correspond au temps où les cellules meneuses commencent à être vue ventralement, 102 minutes correspond au début de l'élongation tardive et 280 minutes au stade 3-fold, pour le *wt*. Barre= 10 μ m. Les pourcentages de létalité embryonnaire ainsi que le stade d'arrêt (H) et les défauts embryonnaires observés ont été mesurés pour chaque génotype.





L'ensemble des résultats suggère que le domaine F-Bar de RGA-7 n'est pas requis lors de la fermeture ventrale. De plus, RGA-7 agirait dans une voie parallèle à PIX-1 et PAK-1 lors de la fermeture ventrale.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Notre étude montre que *rga-7* code pour une GAP qui a une activité spécifique envers CDC-42 et RHO-1 *in vitro*. Nous avons également mis en avant, *in vivo*, la nécessité de cette fonction dans les cellules de l'épiderme du *C. elegans* comme GAP pour CDC-42 afin de contrôler leur migration lors de la fermeture ventrale en parallèle de LET-502, un effecteur connu de RHO-1. De plus, RGA-7 inhibe l'étalement distal de CDC-42 actif et à son accumulation proximale, suggérant donc un rôle de RGA-7 dans la régulation de la distribution de la forme active de CDC-42 à la jonction entre les cellules meneuses de l'hypoderme en cours de migration.

RGA-7 est localisé au niveau des compartiments intracellulaires formant des structures tubulaires et ponctuées. Il est également localisé au niveau de jonctions entre les cellules meneuses en cours de migration à une distance supérieure à 4 micromètres du front de migration. De plus, RGA-7 est exclus du pôle meneur lors de la migration pour devenir présent à une étape plus tardive de la formation des jonctions contralatérales.

D'autre part, nous montrons une interaction de RGA-7 avec WSP-1 et TOCA1/2 qui est antagoniste en début de fermeture ventrale alors qu'ils agissent de concert à une étape plus tardive de la

fermeture ventrale au niveau des jonctions cellule-cellule. RGA-7, avec WSP-1 et TOCA1/2, régulent l'accumulation d'actine et l'extension des jonctions.

Domaines de RGA-7 et impacts possibles sur sa fonction

Le domaine F-Bar est un domaine de liaison aux membranes comme discuté précédemment. La courbure des membranes est impliquée dans plusieurs processus cellulaires importants et les protéines F-Bar se sont imposées comme étant des coordinateurs importants de régulation de cette courbure (Frost et al., 2009). En effet, l'endocytose et la dynamique des vésicules liées à l'actine sont intimement liés puisqu'il a été montré que l'endocytose et le trafic membranaire dépendent tous deux de forces générées par la dynamique de l'actine (Kaksonen et al., 2006). Les protéines possédant un domaine F-Bar sont à cette jonction entre la membrane et la dynamique d'actine.

Chez *C. elegans*, deux autres protéines ayant un domaine F-Bar, ceTOCA1 et ceTOCA2, sont impliquées au niveau de ces processus dans la morphogénèse (Giuliani et al., 2009). Ces protéines sont essentielles dans les voies de signalisation impliquant N-WASP/WASp et WAVE et contrôlant la dynamique de l'actine ainsi que le trafic des membranes (Giuliani et al., 2009). Elles sont essentielles à l'endocytose clathrine-dépendante lors du développement des ovocytes ainsi que lors de la morphogénèse des embryons (Giuliani et al., 2009). ceTOCA2 serait donc un lien entre

l'actine et les membranes durant la morphogénèse (Giuliani et al., 2009).

Une autre protéine chez *C. elegans* ayant un domaine F-Bar et un domaine GAP, SRGP1, est localisé spécifiquement aux jonctions cellule-cellule et joue un rôle important dans la facilitation des adhésions cellule-cellule lors de la morphogénèse de l'épiderme (Zaidel-Bar et al., 2010).

De plus, les protéines avec un domaine F-Bar chez l'Homme sont impliquées au niveau de l'endocytose, la phagocytose, la formation de filopodes, l'adhésion cellulaire et la cytokinèse pour ne nommer que ceux-là (Liu et al., 2015). La plupart de ces protéines ont aussi un domaine SH3 en C-terminal leur permettant d'interagir avec la famille WASP et WAVE. Cela mène à un changement de conformation qui ouvre la structure de WASp/WAVE pour lever son auto-inhibition et ouvrir la structure (Takenawa and Miki, 2001). C'est ainsi que N-WASP/WASp se lie à Arp2/3 et à l'actine pour mener à sa nucléation et polymérisation (Liu et al., 2015). Plusieurs de ces protéines ont été impliquées dans la migration et l'angiogenèse lors de cas de cancer (Takenawa and Miki, 2001; S. Liu et al., 2015).

L'analyse des transgéniques RGA-7I/m Δ F-BAR et RGA-7s suggère que les domaines C1 et GAP seuls peuvent partiellement restaurer la fonction de *rga-7* au cours de la fermeture ventrale. De plus, 30% des embryons portant la forme mutante Δ F-BAR de RGA-7 dans le mutant *rga-7(ok1498)* meurent suite à une rupture de

l'hypoderme au cours de l'élongation tardive contrairement au transgénique RGA-7I/m Δ F-BAR. Ceci suggère donc que l'expression de deux protéines mutantes, une ne contenant pas le domaine GAP et l'autre pas le domaine F-BAR entraîne des défauts de la morphogénèse de l'épiderme non observés dans les embryons du transgénique RGA-7I/m Δ F-BAR et du mutant *rga-7(ok1498)*. D'autre part, la rupture en élongation tardive pourrait provenir d'un défaut des jonctions cellulaires qui fut établi à une étape plus précoce du développement. Ce défaut aurait pu apparaître au moment de la fermeture ventrale et entraîner la rupture de l'embryon au cours de l'élongation tardive.

Ensemble, ces résultats suggèrent que les domaines N-terminaux de RGA-7 joueraient un rôle régulateur sur l'activité de la protéine portée principalement par les domaines C1 et GAP.

Le domaine GAP situé en C-terminal de RGA-7, permet à la protéine de catalyser l'activité GTPasique de RHO-1 au niveau de la spermathèque chez l'adulte (Tan and Zaidel-Bar, 2015) et CDC-42 lors de la fermeture ventrale de l'embryon (Ouellette et al., 2015). La présence du domaine F-BAR dans RGA-7 ainsi que son interaction avec WSP-1/N-WASP/WASp et TOCA1/2/Toca1/FBP17 suggère que RGA-7 jouerait un rôle moléculaire au niveau de la régulation des Rho GTPases, particulièrement de CDC-42 au cours de l'endocytose lors de la morphogénèse du développement embryonnaire chez *C. elegans*.

Les GAPs et GEFs fonctionnent de façon antagoniste pour réguler les GTPases, l'une activant la GTPase en catalysant son activité

d'échange, l'autre l'inactivant en catalysant son activité d'hydrolyse. Nos résultats obtenus dans le chapitre II suggèrent que l'antagonisme observé entre RGA-7 et WSP-1 résulterait d'une potentielle rétroaction positive lors de laquelle WSP-1 activerait CDC-42 via une GEF encore à déterminer au cours de la fermeture ventrale (Ouellette et al., 2015). Une telle GEF, activée par WSP-1 régulerait donc la fermeture ventrale de façon antagoniste à RGA-7. Nous avons montré que PIX-1 n'était pas cette GEF, puisque RGA-7 et PIX-1 régulent ce processus de façon additive (voir légèrement synergique).

Jonctions et trafic membranaire

À la lumière de ces observations, nous émettons l'hypothèse que RGA-7, est impliqué dans la régulation du trafic membranaire, probablement ceux impliquant les protéines jonctionnelles..

Plusieurs études montrent que les cellules épithéliales du *C. elegans* possèdent deux complexes jonctionnels distincts :: le complexe cadhérine-caténine (CCC) et le complexe DLG-1/AJM-1 (DAC) correspondant respectivement adhérentes et aux jonctions serrées chez les vertébrés (Labouesse, 2006).

Le CCC est le complexe le plus apical et inclut des homologues de la E-cadhérine (HMR-1), l' α -caténine (HMP-1), la β -caténine (HMP-2) et un membre de la famille des claudines VAB-9 (Costa et al.,

1998; Pettitt et al., 2003; McMahon et al., 2001). Sa structure est similaire aux complexes présents dans d'autres espèces.

Le complexe DAC comprend DLG-1 et AJM-1, une protéine *coil-coiled* (McMahon et al., 2001). Elles forment un complexe et, *in vivo*, dépendent l'une de l'autre pour leur localisation (McMahon et al., 2001). Les homologues des claudines CLC-1 et CLC-2 colocalisent avec AJM-1 et pourraient aider le complexe à se lier à la membrane (Asano et al., 2003).

Lors de la fermeture ventrale, les cellules migrent et doivent rétablir des jonctions apicales entre les cellules contralatérales. Elles y arrivent grâce au recrutement de membres du CCC *via* HMR-1 et les composants du DAC (Raich et al., 1999). Une fois les cellules épithéliales formées, elles forment rapidement le CeAJ en recrutant les membres du CCC à travers HMR-1. Ce mécanisme ressemble au processus connu chez les mammifères (Vasioukhin et al., 2000; Raich et al., 1999). Les complexes CCC et DAC ne sont pas essentiels pour l'adhésion, l'un compensant l'altération de l'autre (Sakisaka and Takai, 2004). En revanche, une altération des deux entraîne la mort de l'embryon par rupture de la cohésion de l'épiderme (Segbert et al., 2004). D'autre part, lorsque CLC-1 est absente, la régulation du trafic entre les cellules adjacentes est affecté (*paracellular gate function*) (Asano et al., 2003).

En allant étudier certaines de ces protéines et leur relation avec RGA-7, comme HMP-1 ou encore HMR-1 ou DLG-1, il serait alors

possible de mieux comprendre la fonction de RGA-7 au niveau des jonctions.

Orthologues de RGA-7

Des études ont montré, comme mentionné précédemment, l'implication des orthologues de RGA-7 au niveau du trafic des protéines de jonctions et des membranes. PARG1 est un régulateur de Rho au niveau des adhésions cellulaires (Post et al., 2013; Post et al., 2015a) HMHA1 au niveau de la dynamique de l'actine dans la migration et les adhésions focales (de Kreuk et al., 2013) tandis que GMIP régule aussi le cytosquelette d'actine mais au niveau de l'exocytose et de sa polymérisation (McAdara Berkowitz et al., 2001; Hatzoglou et al., 2007).

Ces trois potentiels orthologues, présents chez l'Homme, possèdent des structures complémentaires (Figure 24), contenant ou non un domaine F-Bar consensus, suggérant une possible implication de ces trois protéines dans les mêmes processus ou mécanismes mais de façon complémentaire.

Il serait intéressant de confirmer l'orthologie entre *rga-7* et ces gènes humains en faisant des expériences de sauvetage de phénotype en incorporant une copie de ces protéines par bombardement, comme décrit précédemment, dans des lignées de *C. elegans* mutante pour *rga-7* entre autre. Ainsi, il serait possible

de cibler la ou laquelle(s) de ces protéines est/sont le(s) orthologue(s) de RGA-7.

D'autre part, comme décrit précédemment dans l'introduction, PARG1 forme un complexe avec Radil1 et Rasip1 agissant de concert avec Rap1 pour réduire les fibres de stress et restreindre la signalisation de RhoA. (Xu et al., 2011; Ahmed et al., 2012).

Nous avons montré que RGA-7 était également une GAP pour RHO-1 *in vitro*. L'ensemble suggère donc que RGA-7 pourrait contrôler la distribution spatiale de RHO-1 le long de la jonction entre les cellules hypodermiques mésentériques. Ceci reste cependant à déterminer.

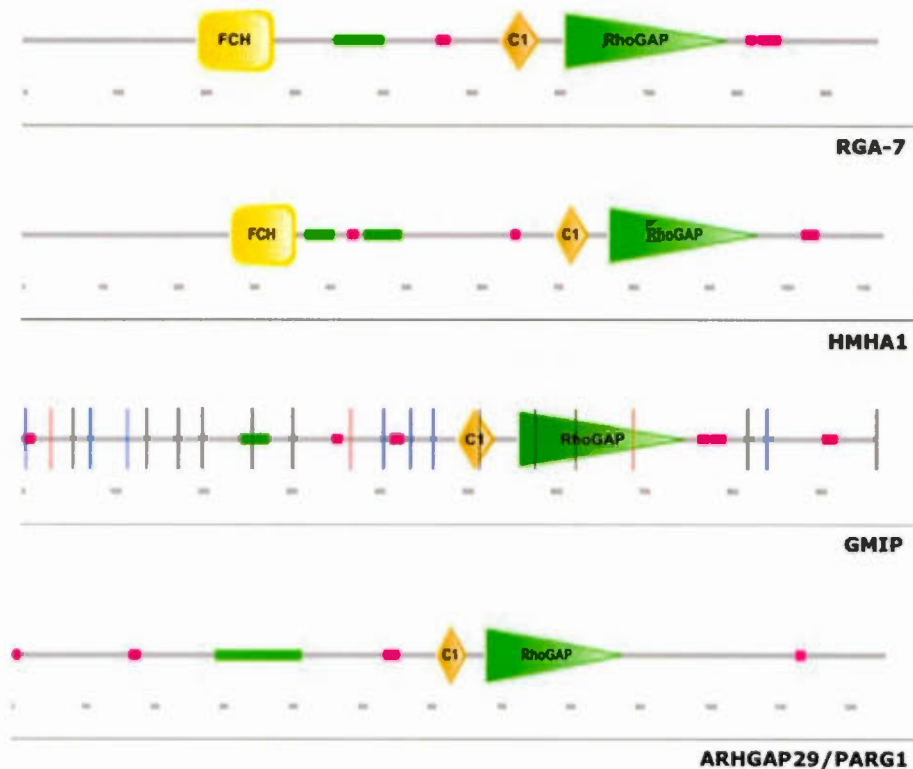
Par ailleurs, sachant que RhoA est essentiel à l'intégrité et le maintien de jonction cellule-cellule et qu'il est impliqué au niveau de la tension des jonctions (Szulcek et al., 2013), un dialogue entre RHO-1 et RGA-7 pourrait être alors mis en place afin de détecter et de répondre au stress mécanique soumis au niveau de la jonction. Un tel rôle de RGA-7/SPV-1 en tant que mécanosenseur a d'ailleurs déjà été exploré par son implication dans la spermathèque où il communiquerait les changements de courbures de la membrane à RHO-1. Ainsi, SPV-1 inactive RHO-1 avec son domaine GAP et du fait même la contraction de la spermathèque lorsqu'il se retrouve à la membrane. Lorsqu'un oocyte entre, la courbure de la membrane change, devenant alors plus droite et le tout mène au détachement de SPV-1, ce qui permet au niveau de RHO-1 actif d'augmenter pour favoriser la contraction (Tan and Zaidel-Bar, 2015).

HMHA 1, un des orthologues de RGA-7 qui contient trois domaines similaires aux domaines F-Bar, C1, GAP de RGA-7, pourrait mettre en lumière une nouvelle fonction du domaine F-Bar.

En effet, il a été montré que HMHA1 sans son domaine F-Bar altère l'organisation du cytosquelette d'actine (de Kreuk et al., 2013). Or, nous avons montré que RGA-7 était impliqué dans l'accumulation d'actine aux jonctions entre les cellules meneuses (Ouellette et al., 2015).

Ceci suggère que le domaine F-Bar de RGA-7 serait important dans l'organisation et l'accumulation de l'actine aux jonctions entre les cellules hypodermiques meneuses au cours de la fermeture ventrale. Il serait donc intéressant d'étudier la distribution de l'actine dans des vers exprimant RGA-7 sans son domaine F-Bar.

Figure 24. Structure et domaines prédits pour les orthologues de RGA-7 chez l'Homme. Les séquences des gènes potentiellement orthologues à RGA-7 : HMHA1 (haut), GMIP (milieu) et PARG1 (bas), furent soumises à SMART (Schultz et al., 1998) pour obtenir une prédiction de domaines présents dans leurs structures tertiaires respectives. Cette prédiction est illustrée sous forme de schémas générés par SMART.



Adapté des données obtenues en utilisant (Schultz et al., 1998)

Finalement, RGA-7 et ses orthologues chez l'humain pourraient donc être des régulateurs clés de CDC-42/Cdc42 en coordonnant des processus tels que l'endocytose ou l'exocytose lors de la migration collective dans des cas de cancer épithéliaux.

Enfin, en supposant que l'hypothèse de l'impact de RGA-7 sur le trafic des membranes et la réorganisation des protéines jonctionnelles se confirme, il serait possible d'envisager que RGA-7 et ses potentiels orthologues agissent de pair avec des acteurs connus au niveau des jonctions serrées ou adhérentes. Chez l'Homme, il serait même possible que les orthologues se partagent la fonction de RGA-7 à cause de la plus grande redondance du génome. Ces hypothèses sont des voies très intéressantes à étudier.

CHAPITRE V

CONCLUSION

De récentes études, dont la notre, montrent RGA-7 agissant comme une GAP pour les GTPases CDC-42 et RHO-1 (Ouellette et al., 2015; Tan and Zaidel-Bar, 2015) à différents stades du cycle de vie de *C. elegans*. Sa fonction est nécessaire au bon déroulement de processus fondamentaux comme la fermeture ventrale (Ouellette et al., 2015).

Ses domaines, notamment son domaine F-Bar et son domaine encore non décrit en N-terminal, soulèvent de nombreuses hypothèses quant à son potentiel rôle au niveau des membranes et des jonctions et plus particulièrement du trafic de celles-ci.

Sachant que RGA-7 possède des orthologues potentiels étant impliqués dans la migration cellulaire et possiblement dans l'invasion des carcinomes, cela met en lumière des rôles possiblement critiques dans la formation de métastases chez l'humain.

Il est donc important de continuer à étudier la fonction moléculaire de RGA-7, chez le *C. elegans*, afin de comprendre les processus fondamentaux de la migration collective et de trouver, à long terme, des potentielles cibles thérapeutiques dans les cas de cancers métastatiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, A.E., Johnson, D.I., Longnecker, R.M., et al. (1990). CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 111, 131-142.
- Adnane, J., Muro-Cacho, C., Mathews, L., et al. (2002). Suppression of rho B expression in invasive carcinoma from head and neck cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 8, 2225-2232.
- Ahmed, S., Lee J Fau - Kozma, R., Kozma R Fau - Best, A., et al. (1993) A novel functional target for tumor-promoting phorbol esters and lysophosphatidic acid. The p21rac-GTPase activating protein n-chimaerin.
- Ahmed, S.M., Theriault, B.L., Uppalapati, M., et al. (2012). KIF14 negatively regulates Rap1a-Radil signaling during breast cancer progression. *J Cell Biol* 199, 951-967.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* 25, 3389-3402.
- Altun, Z.F.a.H., D. H. (2005). Handbook of *C. elegans* Anatomy. In *WormAtlas*.
- Andachi, Y. (2004). *Caenorhabditis elegans* T-box genes *tbx-9* and *tbx-8* are required for formation of hypodermis and body-wall muscle in embryogenesis. *Genes to Cells* 9, 331-344.
- Ando, K., Fukuhara, S., Moriya, T., et al. (2013). Rap1 potentiates endothelial cell junctions by spatially controlling myosin II activity and actin organization. *J Cell Biol* 202, 901-916.
- Andrieu, G., Quaranta, M., Leprince, C., et al. (2014). Gem GTPase acts upstream Gmip/RhoA to regulate cortical actin remodeling and spindle positioning during early mitosis. *Carcinogenesis* 35, 2503-2511.
- Anilkumar, N., Parsons, M., Monk, R., et al. (2003). Interaction of fascin and protein kinase Calpha: a novel intersection in cell adhesion and motility. *The EMBO journal* 22, 5390-5402.
- Anon, E., Serra-Picamal, X., Hersen, P., et al. (2012). Cell crawling mediates collective cell migration to close undamaged epithelial gaps. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 10891-10896.
- Aresta, S., de Tand-Heim, M.F., Beranger, F., et al. (2002). A novel Rho GTPase-activating-protein interacts with Gem, a member of the Ras superfamily of GTPases. *The Biochemical journal* 367, 57-65.

- Armstrong, S.A., Hannah, V.C., Goldstein, J.L., et al. (1995). CAAX geranylgeranyl transferase transfers farnesyl as efficiently as geranylgeranyl to RhoB. *The Journal of biological chemistry* 270, 7864-7868.
- Asano, A., Asano, K., Sasaki, H., et al. (2003). Claudins in *Caenorhabditis elegans*: their distribution and barrier function in the epithelium. *Current biology : CB* 13, 1042-1046.
- Aspenstrom, P. (1997). A Cdc42 target protein with homology to the non-kinase domain of FER has a potential role in regulating the actin cytoskeleton. *Current biology : CB* 7, 479-487.
- Assaker, G., Ramel, D., Wculek, S.K., et al. (2010). Spatial restriction of receptor tyrosine kinase activity through a polarized endocytic cycle controls border cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 22558-22563.
- Baier, A., Ndoh, V.N., Lacy, P., et al. (2014). Rac1 and Rac2 control distinct events during antigen-stimulated mast cell exocytosis. *Journal of leukocyte biology*.
- Baluk, P., Hashizume, H., and McDonald, D.M. (2005). Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Current opinion in genetics & development* 15, 102-111.
- Barrett, K., Leptin, M., and Settleman, J. (1997). The Rho GTPase and a putative RhoGEF mediate a signaling pathway for the cell shape changes in *Drosophila* gastrulation. *Cell* 91, 905-915.
- Bax, B. (1998). Domains of rasGAP and rhoGAP are related. *Nature* 392, 447-447.
- Bellizzi, A., Mangia, A., Chiriatti, A., et al. (2008). RhoA protein expression in primary breast cancers and matched lymphocytes is associated with progression of the disease. *International journal of molecular medicine* 22, 25-31.
- Berezikov, E., Bargmann, C.I., and Plasterk, R.H. (2004). Homologous gene targeting in *Caenorhabditis elegans* by biolistic transformation. *Nucleic acids research* 32, e40.
- Boriack-Sjodin, P.A., Margarit, S.M., Bar-Sagi, D., et al. (1998). The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature* 394, 337-343.
- Boulin, T.E., John F. and Hobert, Oliver. (2006). Reporter Gene fusions. *Wormbook- The C.elegans Research Community*.
- Boureux, A., Vignal, E., Faure, S., et al. (2007). Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Molecular biology and evolution* 24, 203-216.
- Bravo-Cordero, J.J., Magalhaes, M.A., Eddy, R.J., et al. (2013). Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. *Nature reviews. Molecular cell biology* 14, 405-415.

- Brenner, S. (1974). The Genetics of CAENORHABDITIS ELEGANS. *Genetics* 77, 71-94.
- Broders-Bondon, F., Chesneau, A., Romero-Oliva, F., et al. (2007). Regulation of XSnail2 expression by Rho GTPases. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 236, 2555-2566.
- Bu, W., Lim, K.B., Yu, Y.H., et al. (2010). Cdc42 interaction with N-WASP and Toca-1 regulates membrane tubulation, vesicle formation and vesicle motility: implications for endocytosis. *PLoS One* 5, e12153.
- Bucher, E.A., and Seydoux, G. (1994). Gastrulation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Seminars in Developmental Biology* 5, 121-130.
- Campos-Ortega, J.A., and Hartenstein, V. (1985). The Embryonic development of *Drosophila melanogaster*.
- Cerione, R.A., and Zheng, Y. (1996). The Dbl family of oncogenes. *Current opinion in cell biology* 8, 216-222.
- Chant, J., and Herskowitz, I. (1991). Genetic control of bud site selection in yeast by a set of gene products that constitute a morphogenetic pathway. *Cell* 65, 1203-1212.
- Charras, G.T., Hu, C.K., Coughlin, M., et al. (2006). Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs. *J Cell Biol* 175, 477-490.
- Chen, J.L., Fucini, R.V., Lacomis, L., et al. (2005). Coatomer-bound Cdc42 regulates dynein recruitment to COPI vesicles. *J Cell Biol* 169, 383-389.
- Chesarone, M.A., and Goode, B.L. (2009). Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay. *Current opinion in cell biology* 21, 28-37.
- Chin-Sang, I.D., and Chisholm, A.D. (2000). Form of the worm:: genetics of epidermal morphogenesis in *C. elegans*. *Trends in Genetics* 16, 544-551.
- Chisholm, A.D., and Hardin, J. (2005). Epidermal morphogenesis. *WormBook*.
- Chitu, V., and Stanley, E.R. (2007). Pombe Cdc15 homology (PCH) proteins: coordinators of membrane-cytoskeletal interactions. *Trends Cell Biol* 17, 145-156.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., and Burridge, K. (1996). Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol* 133, 1403-1415.
- Colon-Gonzalez, F., and Kazanietz, M.G. (2006). C1 domains exposed: from diacylglycerol binding to protein-protein interactions. *Biochimica et biophysica acta* 1761, 827-837.
- Consortium, C.e.S. (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology.

- Consortium, T.U. (2015). UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Research*. 43: D204-D212.
- Costa, M., Raich, W., Agbunag, C., et al. (1998). A putative catenin-cadherin system mediates morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* embryo. *J Cell Biol* 141, 297-308.
- Côté, J.-F., and Vuori, K. (2007). GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways. *Trends in cell biology* 17, 383-393.
- Crespo, P., Schuebel, K.E., Ostrom, A.A., et al. (1997). Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature* 385, 169-172.
- D'Souza-Schorey, C. (2005). Disassembling adherens junctions: breaking up is hard to do. *Trends Cell Biol* 15, 19-26.
- de Bueger, M., Bakker, A., Van Rood, J.J., et al. (1992). Tissue distribution of human minor histocompatibility antigens. Ubiquitous versus restricted tissue distribution indicates heterogeneity among human cytotoxic T lymphocyte-defined non-MHC antigens. *J Immunol* 149, 1788-1794.
- de Kreuk, B.J., Schaefer, A., Anthony, E.C., et al. (2013). The human minor histocompatibility antigen 1 is a RhoGAP. *PLoS One* 8, e73962.
- de Rooij, J., Rehmann, H., van Triest, M., et al. (2000). Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *The Journal of biological chemistry* 275, 20829-20836.
- Deppe, U., Schierenberg, E., Cole, T., et al. (1978). Cell lineages of the embryo of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75, 376-380.
- DerMardirossian, C., Schnelzer, A., and Bokoch, G.M. (2004). Phosphorylation of RhoGDI by Pak1 mediates dissociation of Rac GTPase. *Molecular cell* 15, 117-127.
- Di-Poi, N., Faure, J., Grizot, S., et al. (2001). Mechanism of NADPH oxidase activation by the Rac/Rho-GDI complex. *Biochemistry* 40, 10014-10022.
- Didsbury, J., Weber, R.F., Bokoch, G.M., et al. (1989). rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *The Journal of biological chemistry* 264, 16378-16382.
- Ding, M., Woo, W.-M., and Chisholm, A.D. (2004). The cytoskeleton and epidermal morphogenesis in *C. elegans*. *Experimental Cell Research* 301, 84-90.
- Dransart, E., Morin, A., Cherfils, J., et al. (2005). Uncoupling of inhibitory and shuttling functions of rho GDP dissociation inhibitors. *The Journal of biological chemistry* 280, 4674-4683.
- Elul, T., and Keller, R. (2000). Monopolar Protrusive Activity: A New Morphogenic Cell Behavior in the Neural Plate Dependent on Vertical

- Interactions with the Mesoderm in *Xenopus*. *Developmental Biology* 224, 3-19.
- Emery, G., and Ramel, D. (2013). Cell coordination of collective migration by Rab11 and Moesin. *Communicative & integrative biology* 6, e24587.
- Erickson, J.W., Zhang, C., Kahn, R.A., et al. (1996). Mammalian Cdc42 is a brefeldin A-sensitive component of the Golgi apparatus. *The Journal of biological chemistry* 271, 26850-26854.
- Etienne-Manneville, S. (2014). Neighborly relations during collective migration. *Current opinion in cell biology* 30, 51-59.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2001). Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC ζ . *Cell* 106, 489-498.
- Farquhar, M.G., and Palade, G.E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 17, 375-412.
- Fehon, R.G., McClatchey, A.I., and Bretscher, A. (2010). Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11, 276-287.
- Francis, R.a.W., Robert H. (1991). Muscle cell attachment in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Cell Biology* 114, 465-479.
- Fricke, R., Gohl, C., and Bogdan, S. (2010). The F-BAR protein family Actin' on the membrane. *Communicative & integrative biology* 3, 89-94.
- Fricke, R., Gohl, C., Dharmalingam, E., et al. (2009). *Drosophila* Cip4/Toca-1 integrates membrane trafficking and actin dynamics through WASP and SCAR/WAVE. *Current biology : CB* 19, 1429-1437.
- Friedl, P., Locker, J., Sahai, E., et al. (2012). Classifying collective cancer cell invasion. *Nature cell biology* 14, 777-783.
- Friedl, P., and Weigelin, B. (2008). Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nature immunology* 9, 960-969.
- Friedl, P., Wolf, K., and Zegers, M.M. (2014). Rho-directed forces in collective migration. *Nature cell biology* 16, 208-210.
- Frost, A., De Camilli, P., and Unger, V.M. (2007). F-BAR proteins join the BAR family fold. *Structure* 15, 751-753.
- Frost, A., Unger, V.M., and De Camilli, P. (2009). The BAR domain superfamily: membrane-molding macromolecules. *Cell* 137, 191-196.
- Fuchs, S., Herzog, D., Sumara, G., et al. (2009). Stage-specific control of neural crest stem cell proliferation by the small rho GTPases Cdc42 and Rac1. *Cell stem cell* 4, 236-247.
- Fukumoto, Y., Kaibuchi, K., Hori, Y., et al. (1990). Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. *Oncogene* 5, 1321-1328.

- Fukuyama, T., Ogita, H., Kawakatsu, T., et al. (2006). Activation of Rac by cadherin through the c-Src-Rap1-phosphatidylinositol 3-kinase-Vav2 pathway. *Oncogene* 25, 8-19.
- Gallop, J.L., and McMahon, H.T. (2005). BAR domains and membrane curvature: bringing your curves to the BAR. *Biochemical Society symposium*, 223-231.
- Gally, C., Wissler, F., Zahreddine, H., et al. (2009). Myosin II regulation during *C. elegans* embryonic elongation: LET-502/ROCK, MRCK-1 and PAK-1, three kinases with different roles. *Development* 136, 3109-3119.
- Garcia-Mata, R., Boulter, E., and Burridge, K. (2011). The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nature reviews. Molecular cell biology* 12, 493-504.
- Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Malacombe, M., et al. (2004). Regulated exocytosis in neuroendocrine cells: a role for subplasmalemmal Cdc42/N-WASP-induced actin filaments. *Molecular biology of the cell* 15, 520-531.
- Georgiou, M., Marinari, E., Burden, J., et al. (2008). Cdc42, Par6, and aPKC regulate Arp2/3-mediated endocytosis to control local adherens junction stability. *Current biology : CB* 18, 1631-1638.
- Gilbert, S. (2000). *Early Development of the Nematode Caenorhabditis elegans* (6th Edition edn). MA: Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Giuliani, C., Troglio, F., Bai, Z., et al. (2009). Requirements for F-BAR proteins TOCA-1 and TOCA-2 in actin dynamics and membrane trafficking during *Caenorhabditis elegans* oocyte growth and embryonic epidermal morphogenesis. *PLoS Genet* 5, e1000675.
- Godt, D., and Laski, F.A. (1995). Mechanisms of cell rearrangement and cell recruitment in *Drosophila* ovary morphogenesis and the requirement of bric a brac. *Development* 121, 173-187.
- Goldstein, B., and Macara, I.G. (2007). The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization. *Dev Cell* 13, 609-622.
- Gorvel, J.P., Chang, T.C., Boretto, J., et al. (1998). Differential properties of D4/LyGDI versus RhoGDI: phosphorylation and rho GTPase selectivity. *FEBS letters* 422, 269-273.
- Goulmy, E. (1996). Human minor histocompatibility antigens. *Current opinion in immunology* 8, 75-81.
- Goulmy, E., Gratama, J.W., Blokland, E., et al. (1983). A minor transplantation antigen detected by MHC-restricted cytotoxic T lymphocytes during graft-versus-host disease. *Nature* 302, 159-161.
- Gulbins, E., Coggeshall, K.M., Baier, G., et al. (1993). Tyrosine kinase-stimulated guanine nucleotide exchange activity of Vav in T cell activation. *Science* 260, 822-825.

- Gulbins, E., Coggeshall, K.M., Baier, G., et al. (1994). Direct stimulation of Vav guanine nucleotide exchange activity for Ras by phorbol esters and diglycerides. *Molecular and cellular biology* 14, 4749-4758.
- Gumbiner, B.M. (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6, 622-634.
- Habas, R., Dawid, I.B., and He, X. (2003). Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes Dev* 17, 295-309.
- Habas, R., Kato, Y., and He, X. (2001). Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell* 107, 843-854.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-514.
- Hambach, L., Nijmeijer, B.A., Aghai, Z., et al. (2006). Human cytotoxic T lymphocytes specific for a single minor histocompatibility antigen HA-1 are effective against human lymphoblastic leukaemia in NOD/scid mice. *Leukemia* 20, 371-374.
- Hambach, L., Vermeij, M., Buser, A., et al. (2008). Targeting a single mismatched minor histocompatibility antigen with tumor-restricted expression eradicates human solid tumors. *Blood* 112, 1844-1852.
- Harden, N., Ricos, M., Ong, Y.M., et al. (1999). Participation of small GTPases in dorsal closure of the *Drosophila* embryo: distinct roles for Rho subfamily proteins in epithelial morphogenesis. *J Cell Sci* 112 (Pt 3), 273-284.
- Hatzoglou, A., Ader, I., Spilingard, A., et al. (2007). Gem associates with Ezrin and acts via the Rho-GAP protein Gmip to down-regulate the Rho pathway. *Molecular biology of the cell* 18, 1242-1252.
- Hausser, A., Storz, P., Link, G., et al. (1999). Protein kinase C μ is negatively regulated by 14-3-3 signal transduction proteins. *The Journal of biological chemistry* 274, 9258-9264.
- Heid, P.J., Raich, W.B., Smith, R., et al. (2001). The Zinc Finger Protein DIE-1 Is Required for Late Events during Epithelial Cell Rearrangement in *C. elegans*. *Developmental Biology* 236, 165-180.
- Henne, W.M., Kent, H.M., Ford, M.G., et al. (2007). Structure and analysis of FCHo2 F-BAR domain: a dimerizing and membrane recruitment module that effects membrane curvature. *Structure* 15, 839-852.
- Herschkowitz, J.I., Simin, K., Weigman, V.J., et al. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome biology* 8, R76.
- Ho, H.Y., Rohatgi, R., Lebensohn, A.M., et al. (2004). Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex. *Cell* 118, 203-216.

- Howell, A.S., and Lew, D.J. (2012). Morphogenesis and the cell cycle. *Genetics* 190, 51-77.
- Hresko, M.C., Williams, B.D., and Waterston, R.H. (1994). Assembly of body wall muscle and muscle cell attachment structures in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 124, 491-506.
- Hurley, J.H., Newton, A.C., Parker, P.J., et al. (1997). Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein science : a publication of the Protein Society* 6, 477-480.
- Ilina, O., and Friedl, P. (2009). Mechanisms of collective cell migration at a glance. *J Cell Sci* 122, 3203-3208.
- Itoh, T., Erdmann, K.S., Roux, A., et al. (2005). Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. *Dev Cell* 9, 791-804.
- Jenna, S., Hussain Nk Fau - Danek, E.I., Danek Ei Fau - Triki, I., et al. (2002). The activity of the GTPase-activating protein CdGAP is regulated by the endocytic protein intersectin.
- Jenna, S.a.L.-V., N. (2003). The Superfamily of Rho GTPase-activating-proteins. New York: Kluwer Academic.
- Johnson, J.L., Monfregola, J., Napolitano, G., et al. (2012). Vesicular trafficking through cortical actin during exocytosis is regulated by the Rab27a effector JFC1/Slp1 and the RhoA-GTPase-activating protein Gem-interacting protein. *Molecular biology of the cell* 23, 1902-1916.
- Kaksonen, M., Toret, C.P., and Drubin, D.G. (2006). Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 7, 404-414.
- Kamioka, Y., Fukuhara, S., Sawa, H., et al. (2004). A novel dynamin-associating molecule, formin-binding protein 17, induces tubular membrane invaginations and participates in endocytosis. *The Journal of biological chemistry* 279, 40091-40099.
- Kazanietz, M.G. (2002). Novel "nonkinase" phorbol ester receptors: the C1 domain connection. *Molecular pharmacology* 61, 759-767.
- Keep, N.H., Barnes, M., Barsukov, I., et al. (1997). A modulator of rho family G proteins, rhoGDI, binds these G proteins via an immunoglobulin-like domain and a flexible N-terminal arm. *Structure* 5, 623-633.
- Keller, R. (2006). Mechanisms of elongation in embryogenesis. *Development* 133, 2291-2302.
- Keller, R., Cooper Ms Fau - Danilchik, M., Danilchik M Fau - Tibbetts, P., et al. (1989). Cell intercalation during notochord development in *Xenopus laevis*. *Journal of experimental zoology*.
- Keller, R., and Winklbauer, R. (1992). Cellular basis of amphibian gastrulation. *Current topics in developmental biology* 27, 39-89.
- Kessels, M.M., and Qualmann, B. (2004). The syndapin protein family: linking membrane trafficking with the cytoskeleton. *J Cell Sci* 117, 3077-3086.

- Khalil, A.A., and Friedl, P. (2010). Determinants of leader cells in collective cell migration. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 2, 568-574.
- Kim, A.S., Kakalis, L.T., Abdul-Manan, N., et al. (2000). Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* 404, 151-158.
- Kimble, J., and Hirsh, D. (1979). The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 70, 396-417.
- Klein, C.A., Wilke, M., Pool, J., et al. (2002). The hematopoietic system-specific minor histocompatibility antigen HA-1 shows aberrant expression in epithelial cancer cells. *The Journal of experimental medicine* 196, 359-368.
- Knaus, U.G., Wang, Y., Reilly, A.M., et al. (1998). Structural requirements for PAK activation by Rac GTPases. *The Journal of biological chemistry* 273, 21512-21518.
- Kovacevic, I., and Cram, E.J. (2010). FLN-1/filamin is required for maintenance of actin and exit of fertilized oocytes from the spermatheca in *C. elegans*. *Dev Biol* 347, 247-257.
- Krey, J.F., Pasca, S.P., Shcheglovitov, A., et al. (2013). Timothy syndrome is associated with activity-dependent dendritic retraction in rodent and human neurons. *Nature neuroscience* 16, 201-209.
- Kulperij, H.B., de Rooij, J., Rehmann, H., et al. (2003). Characterisation of PDZ-GEFs, a family of guanine nucleotide exchange factors specific for Rap1 and Rap2. *Biochimica et biophysica acta* 1593, 141-149.
- Labouesse, M. (2006). Epithelial junctions and attachments. *WormBook*, 1-21.
- Laflamme, C., Assaker, G., Ramel, D., et al. (2012). Evi5 promotes collective cell migration through its Rab-GAP activity. *J Cell Biol* 198, 57-67.
- Lebowitz, P.F., Davide, J.P., and Prendergast, G.C. (1995). Evidence that farnesyltransferase inhibitors suppress Ras transformation by interfering with Rho activity. *Molecular and cellular biology* 15, 6613-6622.
- Leibfried, A., Fricke, R., Morgan, M.J., et al. (2008). *Drosophila* Cip4 and WASp define a branch of the Cdc42-Par6-aPKC pathway regulating E-cadherin endocytosis. *Current biology : CB* 18, 1639-1648.
- Lelias, J.M., Adra, C.N., Wulf, G.M., et al. (1993). cDNA cloning of a human mRNA preferentially expressed in hematopoietic cells and with homology to a GDP-dissociation inhibitor for the rho GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1479-1483.
- Leonard, D., Hart, M.J., Platko, J.V., et al. (1992). The identification and characterization of a GDP-dissociation inhibitor (GDI) for the CDC42Hs protein. *The Journal of biological chemistry* 267, 22860-22868.

- Lessey, E.C., Guilluy, C., and Burridge, K. (2012). From mechanical force to RhoA activation. *Biochemistry* 51, 7420-7432.
- Lippincott, J., and Li, R. (2000). Involvement of PCH family proteins in cytokinesis and actin distribution. *Microscopy research and technique* 49, 168-172.
- Liu, J.P., and Jessell, T.M. (1998). A role for rhoB in the delamination of neural crest cells from the dorsal neural tube. *Development* 125, 5055-5067.
- Liu, S., Xiong, X., Zhao, X., et al. (2015). F-BAR family proteins, emerging regulators for cell membrane dynamic changes-from structure to human diseases. *Journal of hematology & oncology* 8, 47.
- Llense, F., and Martin-Blanco, E. (2008). JNK signaling controls border cell cluster integrity and collective cell migration. *Current biology : CB* 18, 538-544.
- Lundquist, E.A. (2006). Small GTPases. *WormBook*, 1-18.
- Lundquist, E.A., Reddien, P.W., Hartwig, E., et al. (2001). Three *C. elegans* Rac proteins and several alternative Rac regulators control axon guidance, cell migration and apoptotic cell phagocytosis. *Development* 128, 4475-4488.
- Ma, Y., Gong, Y., Cheng, Z., et al. (2015). Critical functions of RhoB in support of glioblastoma tumorigenesis.
- Machacek, M., Hodgson, L., Welch, C., et al. (2009). Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* 461, 99-103.
- Malliri, A., van Es, S., Huveneers, S., et al. (2004). The Rac exchange factor Tiam1 is required for the establishment and maintenance of cadherin-based adhesions. *The Journal of biological chemistry* 279, 30092-30098.
- Marco, E., Wedlich-Soldner, R., Li, R., et al. (2007). Endocytosis optimizes the dynamic localization of membrane proteins that regulate cortical polarity. *Cell* 129, 411-422.
- Margarit, S.M., Sondermann, H., Hall, B.E., et al. (2003). Structural evidence for feedback activation by Ras.GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS. *Cell* 112, 685-695.
- Marston, D.J., and Goldstein, B. (2006). Actin-based forces driving embryonic morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Current opinion in genetics & development* 16, 392-398.
- Martin, E., Harel, S., Nkengfac, B., et al. (2014). *pix-1* Controls Early Elongation in Parallel with *mel-11* and *let-502* in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* 9, e94684.
- Martin-Belmonte, F., Gassama, A., Datta, A., et al. (2007). PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42. *Cell* 128, 383-397.

- Martin-Belmonte, F., and Mostov, K. (2008). Regulation of cell polarity during epithelial morphogenesis. *Current opinion in cell biology* 20, 227-234.
- Mayor, R., and Etienne-Manneville, S. (2016). The front and rear of collective cell migration. *Nature reviews. Molecular cell biology* 17, 97-109.
- Mayor, S., and Pagano, R.E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 603-612.
- McAdara Berkowitz, J.K., Catz, S.D., Johnson, J.L., et al. (2001). JFC1, a novel tandem C2 domain-containing protein associated with the leukocyte NADPH oxidase. *The Journal of biological chemistry* 276, 18855-18862.
- McKeown, C., Praitis, V., and Austin, J. (1998). sma-1 encodes a betaH-spectrin homolog required for *Caenorhabditis elegans* morphogenesis. *Development* 125, 2087-2098.
- McMahon, L., Legouis, R., Vonesch, J.L., et al. (2001). Assembly of *C. elegans* apical junctions involves positioning and compaction by LET-413 and protein aggregation by the MAGUK protein DLG-1. *J Cell Sci* 114, 2265-2277.
- Mehta, D., Rahman, A., and Malik, A.B. (2001). Protein kinase C-alpha signals rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor phosphorylation and rho activation and regulates the endothelial cell barrier function. *The Journal of biological chemistry* 276, 22614-22620.
- Meller, N., Irani-Tehrani M Fau - Ratnikov, B.I., Ratnikov Bi Fau - Paschal, B.M., et al. The novel Cdc42 guanine nucleotide exchange factor, zizimin1, dimerizes via the Cdc42-binding CZH2 domain.
- Moll, J., Sansig, G., Fattori, E., et al. (1991). The murine rac1 gene: cDNA cloning, tissue distribution and regulated expression of rac1 mRNA by disassembly of actin microfilaments. *Oncogene* 6, 863-866.
- Montell, D. (2011). Denise Montell: lighting the way in border cell migration by Caitlin Sedwick. *J Cell Biol* 195, 540-541.
- Mosior, M., and Newton, A.C. (1995). Mechanism of interaction of protein kinase C with phorbol esters. Reversibility and nature of membrane association. *The Journal of biological chemistry* 270, 25526-25533.
- Murphy, A.M., and Montell, D.J. (1996). Cell type-specific roles for Cdc42, Rac, and RhoL in *Drosophila* oogenesis. *J Cell Biol* 133, 617-630.
- Myagmar, B.E., Umikawa, M., Asato, T., et al. (2005). PARG1, a protein-tyrosine phosphatase-associated RhoGAP, as a putative Rap2 effector. *Biochemical and biophysical research communications* 329, 1046-1052.
- Nagawa, S., Xu, T., and Yang, Z. (2010). RHO GTPase in plants: Conservation and invention of regulators and effectors. *Small GTPases* 1, 78-88.

- Nakagawa, H., Miki, H., Ito, M., et al. (2001). N-WASP, WAVE and Mena play different roles in the organization of actin cytoskeleton in lamellipodia. *J Cell Sci* 114, 1555-1565.
- Nelson, W.J.Y., C. and Grindstaff, K.K. (2000). Spatial cues for cellular assymetry in polarized epithelia. Oxford, UK.: Oxford University Press.
- Newton, A.C. (2004). Diacylglycerol's affair with protein kinase C turns 25. *Trends in pharmacological sciences* 25, 175-177.
- Nikolaidou, K.K., and Barrett, K. (2004). A Rho GTPase signaling pathway is used reiteratively in epithelial folding and potentially selects the outcome of Rho activation. *Current biology : CB* 14, 1822-1826.
- Nishizuka, Y. (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334, 661-665.
- Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258, 607-614.
- Nomanbhoy, T.K., Erickson, J.W., and Cerione, R.A. (1999). Kinetics of Cdc42 membrane extraction by Rho-GDI monitored by real-time fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry* 38, 1744-1750.
- Ohmstede, C.A., Farrell, F.X., Reep, B.R., et al. (1990). RAP2B: a RAS-related GTP-binding protein from platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6527-6531.
- Olofsson, B. (1999). Rho Guanine Dissociation Inhibitors: Pivotal Molecules in Cellular Signalling. *Cellular Signalling* 11, 545-554.
- Olson, M.F., Paterson, H.F., and Marshall, C.J. (1998). Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1. *Nature* 394, 295-299.
- Ota, H., Hikita, T., Sawada, M., et al. (2014). Speed control for neuronal migration in the postnatal brain by Gmip-mediated local inactivation of RhoA. *Nature communications* 5, 4532.
- Ouellette, M.H., Martin, E., Lacoste-Caron, G., et al. (2015). Spatial control of active CDC-42 during collective migration of hypodermal cells in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of molecular cell biology*.
- Ouellette MH., M.E., Lacoste-Caron G., Hamiche K. and Jenna S. (2015). Spatial control of active CDC-42 during collective migration of hypodermal cells in *Caenorhabditis elegans*. *JMCB*.
- Pacaud, P., Sauzeau, V., and Loirand, G. (2005). Rho proteins and vascular diseases. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux* 98, 249-254.
- Pannekoek, W.J., Linnemann, J.R., Brouwer, P.M., et al. (2013). Rap1 and Rap2 antagonistically control endothelial barrier resistance. *PLoS One* 8, e57903.
- Pannekoek, W.J., Post, A., and Bos, J.L. (2014). Rap1 signaling in endothelial barrier control. *Cell adhesion & migration* 8, 100-107.

- Papp, H., Czifra, G., Bodo, E., et al. (2004). Opposite roles of protein kinase C isoforms in proliferation, differentiation, apoptosis, and tumorigenicity of human HaCaT keratinocytes. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61, 1095-1105.
- Park, S.Y., Yang, J.S., Schmider, A.B., et al. (2015). Coordinated regulation of bidirectional COPI transport at the Golgi by CDC42. *Nature* 521, 529-532.
- Parker, P.J., and Murray-Rust, J. (2004). PKC at a glance. *J Cell Sci* 117, 131-132.
- Patel, F.B., Bernadskaya, Y.Y., Chen, E., et al. (2008). The WAVE/SCAR complex promotes polarized cell movements and actin enrichment in epithelia during *C. elegans* embryogenesis. *Developmental Biology* 324, 297-309.
- Pettitt, J., Cox, E.A., Broadbent, I.D., et al. (2003). The *Caenorhabditis elegans* p120 catenin homologue, JAC-1, modulates cadherin-catenin function during epidermal morphogenesis. *J Cell Biol* 162, 15-22.
- Piekny, A.J., Johnson, J.-L.F., Cham, G.D., et al. (2003). The *Caenorhabditis elegans* nonmuscle myosin genes *nmy-1* and *nmy-2* function as redundant components of the *let-502*/Rho-binding kinase and *mel-11*/myosin phosphatase pathway during embryonic morphogenesis. *Development* 130, 5695-5704.
- Piekny, A.J., Wissmann, A., and Mains, P.E. (2000). Embryonic Morphogenesis in *Caenorhabditis elegans* Integrates the Activity of LET-502 Rho-Binding Kinase, MEL-11 Myosin Phosphatase, DAF-2 Insulin Receptor and FEM-2 PP2c Phosphatase. *Genetics* 156, 1671-1689.
- Pinner, S., and Sahai, E. (2008). PDK1 regulates cancer cell motility by antagonising inhibition of ROCK1 by RhoE. *Nature cell biology* 10, 127-137.
- Pirraglia, C., Jattani, R., and Myat, M.M. (2006). Rac function in epithelial tube morphogenesis. *Dev Biol* 290, 435-446.
- Pizon, V., Lerosey, I., Chardin, P., et al. (1988). Nucleotide sequence of a human cDNA encoding a ras-related protein (rap1B). *Nucleic acids research* 16, 7719.
- Poincloux, R., Collin, O., Lizarraga, F., et al. (2011). Contractility of the cell rear drives invasion of breast tumor cells in 3D Matrigel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 1943-1948.
- Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.
- Post, A., Pannekoek, W.J., Ponsioen, B., et al. (2015a). Rap1 Spatially Controls ArhGAP29 To Inhibit Rho Signaling during Endothelial Barrier Regulation. *Molecular and cellular biology* 35, 2495-2502.

- Post, A., Pannekoek, W.J., Ponsioen, B., et al. (2015b). Rap1 spatially controls ArhGAP29 to inhibit Rho signaling during endothelial barrier regulation. *Molecular and cellular biology*.
- Post, A., Pannekoek, W.J., Ross, S.H., et al. (2013). Rasip1 mediates Rap1 regulation of Rho in endothelial barrier function through ArhGAP29. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 11427-11432.
- Prendergast, G.C., Khosravi-Far, R., Soltski, P.A., et al. (1995). Critical role of Rho in cell transformation by oncogenic Ras. *Oncogene* *10*, 2289-2296.
- Priess, J.R., and Hirsh, D.I. (1986). *Caenorhabditis elegans* morphogenesis: The role of the cytoskeleton in elongation of the embryo. *Developmental Biology* *117*, 156-173.
- Primeau, M., and Lamarche-Vane, N. (2008). [A brief overview of the small Rho GTPases]. *Medecine sciences : M/S* *24*, 157-162.
- Rahman, G.M., and Das, J. (2015). Modeling studies on the structural determinants for the DAG/phorbol ester binding to C1 domain. *Journal of biomolecular structure & dynamics* *33*, 219-232.
- Raich, W.B., Agbunag, C., and Hardin, J. (1999). Rapid epithelial-sheet sealing in the *Caenorhabditis elegans* embryo requires cadherin-dependent filopodial priming. *Current Biology* *9*, 1139-S1131.
- Ramakers, G.J. (2000). Rho proteins and the cellular mechanisms of mental retardation. *American journal of medical genetics* *94*, 367-371.
- Ramel, D., Wang, X., Laflamme, C., et al. (2013). Rab11 regulates cell-cell communication during collective cell movements. *Nature cell biology* *15*, 317-324.
- Ramos, J.W., and DeSimone, D.W. (1996). *Xenopus* embryonic cell adhesion to fibronectin: position-specific activation of RGD/synergy site-dependent migratory behavior at gastrulation. *J Cell Biol* *134*, 227-240.
- Reffay, M., Parrini, M.C., Cochet-Escartin, O., et al. (2014). Interplay of RhoA and mechanical forces in collective cell migration driven by leader cells. *Nature cell biology* *16*, 217-223.
- Ren, R., Nagel, M., Tahinci, E., et al. (2006). Migrating anterior mesoderm cells and intercalating trunk mesoderm cells have distinct responses to Rho and Rac during *Xenopus* gastrulation. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* *235*, 1090-1099.
- Ridley, A.J. (2011). Life at the leading edge. *Cell* *145*, 1012-1022.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., et al. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* *302*, 1704-1709.
- Ridley, A.J., Self, A.J., Kasmi, F., et al. (1993). rho family GTPase activating proteins p190, bcr and rhoGAP show distinct specificities in vitro and in vivo. *The EMBO journal* *12*, 5151-5160.

- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., et al. (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 97, 221-231.
- Rojas, A.M., Fuentes, G., Rausell, A., et al. (2012). The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *J Cell Biol* 196, 189-201.
- Ron, D., Zannini, M., Lewis, M., et al. (1991). A region of proto-dbl essential for its transforming activity shows sequence similarity to a yeast cell cycle gene, CDC24, and the human breakpoint cluster gene, bcr. *The New biologist* 3, 372-379.
- Roof, R.W., Haskell Md Fau - Dukes, B.D., Dukes Bd Fau - Sherman, N., et al. (1998) Phosphotyrosine (p-Tyr)-dependent and -independent mechanisms of p190 RhoGAP-p120 RasGAP interaction: Tyr 1105 of p190, a substrate for c-Src, is the sole p-Tyr mediator of complex formation.
- Ruth, M.C., Xu, Y., Maxwell, I.H., et al. (2006). RhoC promotes human melanoma invasion in a PI3K/Akt-dependent pathway. *The Journal of investigative dermatology* 126, 862-868.
- Sabharanjak, S., Sharma, P., Parton, R.G., et al. (2002). GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Dev Cell* 2, 411-423.
- Sahai, E., and Marshall, C.J. (2002). RHO-GTPases and cancer. *Nature reviews. Cancer* 2, 133-142.
- Sakisaka, T., and Takai, Y. (2004). Biology and pathology of nectins and nectin-like molecules. *Current opinion in cell biology* 16, 513-521.
- Sato, N., Fukui, T., Taniguchi, T., et al. (2007). RhoB is frequently downregulated in non-small-cell lung cancer and resides in the 2p24 homozygous deletion region of a lung cancer cell line. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 120, 543-551.
- Sawa, M., Suetsugu, S., Sugimoto, A., et al. (2003). Essential role of the *C. elegans* Arp2/3 complex in cell migration during ventral enclosure. *Journal of Cell Science* 116, 1505-1518.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., et al. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5857-5864.
- Segbert, C., Johnson, K., Theres, C., et al. (2004). Molecular and functional analysis of apical junction formation in the gut epithelium of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 266, 17-26.
- Shaye, D.D., and Greenwald, I. (2011). OrthoList: A Compendium of *C. elegans* Genes with Human Orthologs. *PLoS ONE* 6, e20085.

- Sheffield, M., Loveless, T., Hardin, J., et al. (2007). *C. elegans* Enabled Exhibits Novel Interactions with N-WASP, Abl, and Cell-Cell Junctions. *Current Biology* 17, 1791-1796.
- Shimada, A., Niwa, H., Tsujita, K., et al. (2007). Curved EFC/F-BAR-domain dimers are joined end to end into a filament for membrane invagination in endocytosis. *Cell* 129, 761-772.
- Slaughter, B.D., Das, A., Schwartz, J.W., et al. (2009). Dual modes of cdc42 recycling fine-tune polarized morphogenesis. *Dev Cell* 17, 823-835.
- Smith, P.G., Roy, C., Zhang, Y.N., et al. (2003). Mechanical stress increases RhoA activation in airway smooth muscle cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 28, 436-442.
- Soto, M.C., Qadota, H., Kasuya, K., et al. (2002). The GEX-2 and GEX-3 proteins are required for tissue morphogenesis and cell migrations in *C. elegans*. *Genes & Development* 16, 620-632.
- Soulard, A., Lechler, T., Spiridonov, V., et al. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* Bzz1p is implicated with type I myosins in actin patch polarization and is able to recruit actin-polymerizing machinery in vitro. *Molecular and cellular biology* 22, 7889-7906.
- Spierings, E., Wieles, B., and Goulmy, E. (2004). Minor histocompatibility antigens--big in tumour therapy. *Trends in immunology* 25, 56-60.
- St Johnston, D., and Ahringer, J. (2010). Cell polarity in eggs and epithelia: parallels and diversity. *Cell* 141, 757-774.
- Su, L., Agati Jm Fau - Parsons, S.J., and Parsons, S.J. (2003) p190RhoGAP is cell cycle regulated and affects cytokinesis.
- Sulston, J.E., and Horvitz, H.R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 56, 110-156.
- Sulston, J.E., Schierenberg, E., White, J.G., et al. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 100, 64-119.
- Suzuki, A., and Ohno, S. (2006). The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *J Cell Sci* 119, 979-987.
- Szulcek, R., Beckers, C.M., Hodzic, J., et al. (2013). Localized RhoA GTPase activity regulates dynamics of endothelial monolayer integrity. *Cardiovascular research* 99, 471-482.
- Tahinci, E., and Symes, K. (2003). Distinct functions of Rho and Rac are required for convergent extension during *Xenopus* gastrulation. *Dev Biol* 259, 318-335.
- Taira, K., Umikawa, M., Takei, K., et al. (2004). The Traf2- and Nck-interacting kinase as a putative effector of Rap2 to regulate actin cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry* 279, 49488-49496.

- Takenawa, T., and Miki, H. (2001). WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci* *114*, 1801-1809.
- Takenawa, T., and Suetsugu, S. (2007). The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nature reviews. Molecular cell biology* *8*, 37-48.
- Tambe, D.T., Hardin, C.C., Angelini, T.E., et al. (2011). Collective cell guidance by cooperative intercellular forces. *Nature materials* *10*, 469-475.
- Tan, P.Y., and Zaidel-Bar, R. (2015). Transient membrane localization of SPV-1 drives cyclical actomyosin contractions in the *C. elegans* spermatheca. *Current biology : CB* *25*, 141-151.
- Tcherkezian, J., and Lamarche-Vane, N. (2007). Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* *99*, 67-86.
- Thomas-Virnic, C.L., Sims, P.A., Simske, J.S., et al. (2004). The Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Regulates Epidermal Cell Migration in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology* *14*, 1882-1887.
- Trifaro, J.M., Gasman, S., and Gutierrez, L.M. (2008). Cytoskeletal control of vesicle transport and exocytosis in chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* *192*, 165-172.
- Tsujita, K., Suetsugu, S., Sasaki, N., et al. (2006). Coordination between the actin cytoskeleton and membrane deformation by a novel membrane tubulation domain of PCH proteins is involved in endocytosis. *J Cell Biol* *172*, 269-279.
- Turcotte, S., Desrosiers, R.R., and Beliveau, R. (2003). HIF-1 α mRNA and protein upregulation involves Rho GTPase expression during hypoxia in renal cell carcinoma. *J Cell Sci* *116*, 2247-2260.
- Van Aelst, L., and D'Souza-Schorey, C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* *11*, 2295-2322.
- Van Aelst, L., and Symons, M. (2002). Role of Rho family GTPases in epithelial morphogenesis. *Genes Dev* *16*, 1032-1054.
- Van Aken, E., De Wever, O., Correia da Rocha, A.S., et al. (2001). Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* *439*, 725-751.
- van Golen, K.L., Wu Zf Fau - Qiao, X.T., Qiao Xt Fau - Bao, L.W., et al (2000). RhoC GTPase, a novel transforming oncogene for human mammary epithelial cells that partially recapitulates the inflammatory breast cancer phenotype.
- Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M., et al. (2000). Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* *100*, 209-219.

- Vázquez-Manrique, R.P., Nagy, A.I., Legg, J.C., et al. (2008). Phospholipase C- ϵ Regulates Epidermal Morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 4, e1000043.
- Vicente-Manzanares, M., Choi, C.K., and Horwitz, A.R. (2009a). Integrins in cell migration--the actin connection. *J Cell Sci* 122, 199-206.
- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., et al. (2009b). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10, 778-790.
- Wang, X., He, L., Wu, Y.I., et al. (2010). Light-mediated activation reveals a key role for Rac in collective guidance of cell movement in vivo. *Nature cell biology* 12, 591-597.
- Warner, S.J., Yashiro, H., and Longmore, G.D. (2010). The Cdc42/Par6/aPKC polarity complex regulates apoptosis-induced compensatory proliferation in epithelia. *Current biology : CB* 20, 677-686.
- Watanabe, N., Kato, T., Fujita, A., et al. (1999). Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nature cell biology* 1, 136-143.
- Weber, G.F., Bjerke, M.A., and DeSimone, D.W. (2012). A mechanoresponsive cadherin-keratin complex directs polarized protrusive behavior and collective cell migration. *Dev Cell* 22, 104-115.
- Weis, S.M. (2008). Vascular permeability in cardiovascular disease and cancer. *Current opinion in hematology* 15, 243-249.
- Williams-Masson, E.M., Heid, P.J., Lavin, C.A., et al. (1998). The Cellular Mechanism of Epithelial Rearrangement during Morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* Dorsal Hypodermis. *Developmental Biology* 204, 263-276.
- Williams-Masson, E.M., Malik, A.N., and Hardin, J. (1997). An actin-mediated two-step mechanism is required for ventral enclosure of the *C. elegans* hypodermis. *Development* 124, 2889-2901.
- Winklbauer, R., and Schurfeld, M. (1999). Vegetal rotation, a new gastrulation movement involved in the internalization of the mesoderm and endoderm in *Xenopus*. *Development* 126, 3703-3713.
- Wissmann, A., Ingles, J., and Mains, P.E. (1999). The *Caenorhabditis elegans* mel-11 myosin phosphatase regulatory subunit affects tissue contraction in the somatic gonad and the embryonic epidermis and genetically interacts with the Rac signaling pathway. *Dev Biol* 209, 111-127.
- Withee, J., Galligan, B., Hawkins, N., et al. (2004). *Caenorhabditis elegans* WASP and Ena/VASP Proteins Play Compensatory Roles in Morphogenesis and Neuronal Cell Migration. *Genetics* 167, 1165-1176.

- Wolf, K., and Friedl, P. (2009). Mapping proteolytic cancer cell-extracellular matrix interfaces. *Clinical & experimental metastasis* 26, 289-298.
- Woolner, S., Jacinto, A., and Martin, P. (2005). The small GTPase Rac plays multiple roles in epithelial sheet fusion--dynamic studies of *Drosophila* dorsal closure. *Dev Biol* 282, 163-173.
- Wu, X., Tu, X., Joeng, K.S., et al. (2008). Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. *Cell* 133, 340-353.
- Xu, K., Sacharidou, A., Fu, S., et al. (2011). Blood vessel tubulogenesis requires Rasip1 regulation of GTPase signaling. *Dev Cell* 20, 526-539.
- Xu, N., Keung, B., and Myat, M.M. (2008). Rho GTPase controls invagination and cohesive migration of the *Drosophila* salivary gland through Crumbs and Rho-kinase. *Dev Biol* 321, 88-100.
- Yamada, S., and Nelson, W.J. (2007). Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 178, 517-527.
- Yamaguchi, H., and Condeelis, J. (2007). Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochimica et biophysica acta* 1773, 642-652.
- Zaidel-Bar, R., Joyce, M.J., Lynch, A.M., et al. (2010). The F-BAR domain of SRGP-1 facilitates cell-cell adhesion during *C. elegans* morphogenesis. *J Cell Biol* 191, 761-769.
- Zalcman, G., Closson, V., Linares-Cruz, G., et al. (1995). Regulation of Ras-related RhoB protein expression during the cell cycle. *Oncogene* 10, 1935-1945.
- Zerial, M., and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2, 107-117.
- Zhang, H., Landmann, F., Zahreddine, H., et al. (2011). A tension-induced mechanotransduction pathway promotes epithelial morphogenesis. *Nature* 471, 99-103.
- Zheng, Y., Zangrilli, D., Cerione, R.A., et al. (1996). The pleckstrin homology domain mediates transformation by oncogenic db1 through specific intracellular targeting. *The Journal of biological chemistry* 271, 19017-19020.
- Zheng, Z., Liu, B., and Wu, X. (2015). RhoGDI2 up-regulates P-glycoprotein expression via Rac1 in gastric cancer cells. *Cancer cell international* 15, 41.
- Zohn, I.E., Li, Y., Skolnik, E.Y., et al. (2006). p38 and a p38-interacting protein are critical for downregulation of E-cadherin during mouse gastrulation. *Cell* 125, 957-969.